

Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der NO-sensitiven Guanylat-Cyclase und zu ihrer subzellulären Lokalisation

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Mareike Irene Busker

aus Offenbach am Main

1. Referent: Professor Dr. Sönke Behrends
 2. Referent: Professor Dr. Ingo Rustenbeck
 3. Referent: Seniorprofessor Dr. Theodor Dingermann
- eingereicht am: 30.10.2013
- Disputation am: 21.02.2014
- Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Busker, M., Neidhardt, I., and Behrends, S. (2014). Nitric oxide activation of guanylate cyclase pushes the alpha1 signaling helix and the beta1 heme-binding domain closer to the substrate-binding site. *J Biol Chem* 289, 476-484.

Tagungsbeiträge

Busker, M.; Haase, N.; Haase, T.; Kraehling, J. R.; Linnenbaum, M.; Oberle, S.; Behrends, S.: Förster Resonance Energy Transfer between 2'-MANT-3'dGTP and nitric oxide sensitive guanylyl cyclase (Poster). Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2010, Braunschweig (2010), <http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00038117>

Busker, M.; Kraehling, J. R.; Seeanner, M.; Behrends, S.: Analysis of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activation by ciguates based on MANT-GTP fluorescence (Poster). WorldPharma 2010, Copenhagen, Denmark (2010), *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* Volume: 107 Issue: s1 Pages: 162-692, 2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1.	Der NO / cGMP Signalweg	7
1.1.1.	Stickstoffmonoxid-Synthasen	7
1.1.2.	Die NOsGC	9
1.1.3.	Zielstrukturen für cGMP	12
1.2.	Der NO / cGMP-Signalweg als Angriffspunkt für Arzneistoffe	14
1.2.1.	Zugelassene Wirkstoffe mit Angriffspunkten im NO / cGMP-Signalweg	14
1.2.2.	NOsGC-Stimulatoren	15
1.2.3.	NOsGC-Aktivatoren	17
1.3.	Domänenorganisation der NOsGC	18
1.3.1.	HNOX-Domäne	19
1.3.2.	PAS-Domäne	21
1.3.3.	Coiled-coil Domäne	21
1.3.4.	Katalytische Domäne	22
1.4.	Membranständige Guanylat-Cyclasen als Vorbild für den Aktivierungsmechanismus der NOsGC	23
1.4.1.	Fluoreszierende Nukleotide	25
1.5.	Fluoreszenzsensoren	27
2	ZIELSETZUNG	31
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1.	Material	32
3.1.1.	Hilfsmittel und Geräte	32
3.1.2.	Chemikalien und Substanzen	34
3.1.3.	Reagenziensysteme	36
3.1.4.	Puffer und Lösungen	36
3.1.5.	Zellen	37
3.1.6.	Zellkulturmedien	38
3.1.7.	Antikörper	38
3.1.8.	Vektoren und DNA	39
3.1.9.	Oligonukleotide für Mutagenesen	40
3.1.10.	Verwendete Programme	40
3.2.	Methoden	41
3.2.1.	Molekularbiologische Methoden	41
3.2.2.	Proteinexpression in HEK293-Zellen	45
3.2.3.	Proteinexpression im Sf9 / Baculovirussystem	47
3.2.4.	Reinigung der in Sf9-Zellen exprimierten Proteine	49
3.2.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
3.2.6.	SDS-PAGE und Western Blot	51
3.2.7.	Bestimmung der spezifischen Guanylat-Cyclase-Aktivität	52
3.2.8.	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	53
3.2.9.	Spektrofluorimetrische Messungen	54

3.2.10.	Photometrische Messungen	58
3.2.11.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	58
3.2.12.	Statistische Auswertung	62
4	ERGEBNISSE	63
4.1.	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer zwischen NOsGC und 2'-Mant-3'-dGTP	63
4.1.1.	FRET zwischen der unveränderten NOsGC und der Mant-Gruppe	63
4.1.2.	NO-induzierter Anstieg der FRET-Effizienz zwischen Tryptophanen und der Mant-Gruppe	64
4.1.3.	Mutation der Tryptophane der NOsGC	65
4.1.4.	Vergleich der FRET-Effizienzen der unveränderten NOsGC und ihrer Mutanten	70
4.1.5.	Tryptophan 466 ist notwendig und ausreichend für den NO-induzierten FRET-Effizienzanstieg des Wildtyp-Enzyms	72
4.1.6.	Wechselwirkungen zwischen Tryptophan 602 und Tryptophan 22	73
4.1.7.	Unveränderte Hämbindungseigenschaft aller Tryptophan-Mutanten	76
4.1.8.	Regeneration der NO-stimulierten Aktivität durch BAY 41-2272 und BAY 41-8543	77
4.2.	Messung der Eigenfluoreszenz des an die NOsGC gebundenen 2'-Mant-3'-dGTP	81
4.2.1.	Fluoreszenz-Anstieg der Mant-Gruppe bei Bindung an die NOsGC	81
4.2.2.	Vergleich der Fluoreszenz-Anstiege der Mant-Gruppe bei Bindung an die NOsGC-Mutanten	85
4.2.3.	Verlust der Häm-Gruppe durch Mutation des W22 der β_1 -Untereinheit zu Alanin	87
4.3.	Subzelluläre Lokalisation der NOsGC Isoform α_2 / β_1	89
4.3.1.	Nur das Heterodimer liegt an Zell-Zell-Kontakten	89
4.3.2.	Phosphorylierung der α_2 -Untereinheit	93
4.3.3.	Interaktion mit dem Polaritätsprotein Scribble	98
4.4.	NOsGC als Fluoreszenzsensor	101
4.4.1.	Aufbau	101
4.4.2.	Charakterisierung	102
4.4.3.	$\beta_1\alpha_1$ FlnG als Sensor für NO und Cinaciguat	104
4.4.4.	β_1 FlnG α_2 als Sensor der NOsGC-Aktivität an Zell-Zell-Kontakten	109
5	DISKUSSION	112
5.1.	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen NOsGC und 2'-Mant-3'-dGTP	112
5.1.1.	Die coiled-coil Domäne als Signal-Helix	113
5.1.2.	Rolle des W22 in der HNOX-Domäne	114
5.1.3.	Art der W22/W602 Interaktion	115
5.1.4.	Mögliche Interaktion zwischen der Häm-Gruppe und W22	116
5.1.5.	Modell der NOsGC Signaltransduktion basierend auf den FRET-Daten	116
5.1.6.	Vergleich mit bestehenden Modellen der NOsGC	117
5.1.7.	Auswirkung auf die katalytische Domäne: Das Zangenmodell	119
5.1.8.	Veränderung der Umgebung der Mant-Gruppe in der katalytischen Domäne	121
5.1.9.	Konformationsänderung der katalytischen Domäne durch Stimulation	124
5.1.10.	Untersuchungen der Signaltransduktion der α_2 / β_1 -Isoform der NOsGC	126
5.1.11.	Ausblick	126
5.2.	Lokalisation der α_2 / β_1-Isoform	128
5.2.1.	Dynamische Regulation der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform	129
5.2.2.	Interaktion mit dem Polaritätsprotein Scribble	132

5.3.	NOsGC als Fluoreszenzsensor	135
5.3.1.	Funktionsweise des NOsGC Fluoreszenzsensors	135
5.3.2.	Nutzung des NOsGC-Fluoreszenzsensors	138
5.3.3.	Ausblick	140
6	ZUSAMMENFASSUNG	141
7	LITERATURVERZEICHNIS	142
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	163
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	166
10	TABELLENVERZEICHNIS	168
11	ANHANG	169
	DANKSAGUNGEN	174

1 EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland¹. Aus diesem Grund besteht ein besonderes Interesse an der Therapie dieser Erkrankungen und der Entwicklung neuer Arzneistoffe auf diesem Gebiet.

Stickstoffmonoxid-freisetzende Pharmaka, wie das organische Nitrat Glyceroltrinitrat (GTN), aktivieren die Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylat-Cylcase (NOsGC), das zentrale Enzym des NO / cGMP-Signalwegs (Arnold et al., 1977; Katsuki et al., 1977; Miki et al., 1977). Diese bewährte Arzneistoffklasse ist heute die Standardtherapie bei der Behandlung kardiovaskulärer Notfälle, weist aber Nachteile in der Langzeittherapie auf (Ferreira und Mochly-Rosen, 2012). In den letzten Jahren rückte daher die NOsGC als möglicher Angriffspunkt für neue Arzneistoffe in den Fokus. Riociguat, ein Stimulator der NOsGC, hat bereits die Phase III der klinischen Studien durchlaufen und die Zulassung für die Indikation pulmonale arterielle Hypertonie wird für die EU in Kürze erwartet. In Kanada und den USA ist der Wirkstoff seit Herbst 2013 zugelassen. Der vollständige Wirkmechanismus dieser neuen Arzneistoffklasse und auch die intramolekulare Weiterleitung des NO-stimulierten Aktivierungssignals der NOsGC sind noch nicht geklärt. Die vorliegende Arbeit soll zum Verständnis dieser Vorgänge beitragen.

1.1. Der NO / cGMP Signalweg

1.1.1. Stickstoffmonoxid-Synthasen

Die Biosynthese von Stickstoffmonoxid (NO) wird beim Menschen durch drei unterschiedliche Isoformen von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) katalysiert: der endothelialen NOS (eNOS), der neuronalen NOS (nNOS) und der induzierbaren NOS (iNOS) (Förstermann und Kleinert, 1995; Griffith und Stuehr, 1995). Die homodimeren Enzyme binden molekularen Sauerstoff an die prosthetisch gebundenen Häm-Gruppen und setzen in Anwesenheit von Tetrahydrobiopterin (BH₄) die basische Aminosäure L-Arginin zu Citrullin und dem NO-Radikal um (Palmer et al., 1988; Schmidt et al., 1988). Die Reduktionsäquivalente, die für diese Reaktion benötigt werden, werden von der FMN- und FAD-haltigen Reduktase-Domäne der NOS aus NADPH zur Verfügung gestellt. Dieser Elektronentransport wird durch Calmodulin (CaM) reguliert (Bredt und Snyder, 1990; Mulsch et al., 1989). Die konstitutiv exprimierten neuronalen und endothelialen Isoformen binden Calmodulin in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration, wohingegen die induzierbare Isoform von Ca²⁺ unabhängig

¹ <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html> 22.06.2013

ist (zur Übersicht: Pfeiffer, 1999). Die drei Isoformen der NOS unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens, ihrer katalytischen Eigenschaften und ihrer Funktion.

Die endotheliale NOS wird hauptsächlich in Endothelzellen, Thrombozyten und Herzmuskelzellen exprimiert. Das von ihr produzierte NO wird auch als EDRF („endothelium-derived relaxing factor“) bezeichnet über dessen Nachweis die Aufklärung des NO / cGMP-Signalwegs gelang. EDRF wurde 1980 von Furchgott und Zawadzki bei ihren Untersuchungen an isolierten Kaninchen-Aorten entdeckt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Sie stellten fest, dass Acetylcholin sowohl zu einer Kontraktion als auch zu einer Relaxation von Aorten führen kann. Gefäßpräparate, deren Intima während den Vorbereitungen einer starken Reibung ausgesetzt waren, reagierten auf Acetylcholin mit einer Kontraktion, während Präparate, die vorsichtig behandelt wurden eine Relaxation zeigten. Furchgott und Zawadzki schlossen daraus, dass durch die Reibung die Endothelzellen der Aorten entfernt wurden. Sie vermuteten, dass Acetylcholin durch Bindung an muskarinische Rezeptoren auf den Endothelzellen zur Freisetzung einer diffundierenden Substanz führt, welche die Relaxation der glatten Gefäßmuskeln auslöst. In einem „Sandwich“-Experiment, wurde eine von Endothelzellen befreite und daher zur Relaxation unfähige Aorta, auf eine Aorta mit intakter Intima gelegt. Bei dieser so präparierten Aorta führte Acetylcholin wieder zu einer Relaxation (Furchgott und Zawadzki, 1980). Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung von Furchgott und Zawadzki, dass eine zur Diffusion fähige Substanz der Auslöser für die Relaxation der Gefäßmuskelzellen ist und sie nannten diese Substanz EDRF („endothelium-derived-relaxing-factor“) (Cherry et al., 1982). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch unklar, um welche chemische Substanz es sich bei EDRF handelt. Rapoport und Murad konnten nachweisen, dass EDRF die cGMP-Synthese an isolierten Blutgefäßen und die Proteinphosphorylierung in glatten Muskelzellen steigert und vermuteten, dass es sich bei EDRF um einen endogenen Nitro-Vasodilatator handelt (Rapoport et al., 1983; Rapoport und Murad, 1983). Wenige Jahre später entdeckten Ignarro und Palmer unabhängig voneinander, dass es sich bei EDRF um das gasförmige Radikal NO handelt (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). 1998 wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin an Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferrid Murad für ihre Entdeckung des NO als Signalmolekül im Herz-Kreislaufsystem verliehen (Furchgott, 1999; Ignarro et al., 1999; Murad, 1999). Kurz nach dieser Entdeckung, konnte gezeigt werden, dass NO aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird und dass diese Reaktion von der NO-Synthase katalysiert wird (Bredt und Snyder, 1990; Palmer et al., 1988; Schmidt et al., 1988).

Die eNOS wird durch mechanische Dehnung und hohe Scherkräfte im Gefäßsystem, durch Acetylcholin, durch Bradykinin und weitere Signale stimuliert (Nishida et al., 1992). Aktivierung der eNOS führt zur Vasodilatation, Hemmung des Wachstums der glatten Muskulatur der Gefäßwände, Hemmung der Thrombozytenaggregation / Thrombozytenadhäsion und zur Verminderung der Adhäsion von Monozyten an das Endothel (Loscalzo und Welch, 1995). Die nNOS wird in neuronalen

Zellen im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. Im zentralen Nervensystem ist sie an der Langzeitpotenzierung beteiligt. Im peripheren Nervensystem dient das von ihr produzierte NO als Signalüberträger an verschiedenen Zielorganen: den Blutgefäßen, dem Magendarmtrakt und dem Corpus cavernosum des Penis. Die Expression der iNOS erfolgt als Antwort auf inflammatorische Zytokine und andere Stimuli, die mit Infektionen einhergehen. Die großen Mengen an NO, welche die iNOS produziert, dienen dazu Pathogene zu inaktivieren und sind somit an der Immunabwehr beteiligt (zur Übersicht: Förstermann und Kleinert, 1995; Förstermann und Sessa, 2012; Pfeiffer, 1999). Die Mehrzahl der durch die verschiedenen Isoformen der NOS ausgelösten Effekte wird durch die Bindung des produzierten NO an die NOsGC und einen Anstieg des sekundären Botenstoffs cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt.

1.1.2. Die NOsGC

Viele physiologische Funktionen des NO im kardiovaskulären, gastrointestinalen und neuronalen System werden durch den intrazellulären Rezeptor NO-sensitive Guanylat-Cyclase (NOsGC) vermittelt (Abbildung 1). Die NOsGC besteht aus zwei homolog aufgebauten Untereinheiten: einer α - und einer β -Untereinheit. Damit ein katalytisch aktives Enzym entsteht, muss die Heterodimerisierung der beiden Untereinheiten erfolgen (Buechler et al., 1991; Harteneck et al., 1990; Zabel et al., 1998). Allerdings findet diese Heterodimerisierung nur bei Koexpression der beiden Untereinheiten statt. Die einzelne Expression der Untereinheiten führt nicht zu einem katalytisch aktiven Enzym (Buechler et al., 1991; Harteneck et al., 1990). Vier verschiedene Untereinheiten als Produkte vier unterschiedlicher Gene wurden bisher identifiziert: α_1 , α_2 , β_1 und β_2 (Zabel et al., 1998). Von diesen können nur die α_1 / β_1 -Isoform und die α_2 / β_1 -Isoform durch NO aktiviert werden (Russwurm et al., 1998). Die am häufigsten vorkommenden Untereinheiten sind die α_1 - und β_1 -Untereinheit, welche ubiquitär in Geweben von Säugern exprimiert werden und in besonders hohen Konzentrationen im Herzen, in der Niere, in der Lunge, im Darm, in der Aorta und im Gehirn vorkommen (Budworth et al., 1999; Mergia et al., 2003). Die cDNA dieser Untereinheiten wurde zunächst aus der Lunge von Ratten und Rindern isoliert (Koesling et al., 1990; Koesling et al., 1988; Nakane et al., 1990; Nakane et al., 1988). Die α_2 -Untereinheit, sowie die humane α_1 -Untereinheit (82 kDa) und die humane β_1 -Untereinheit (70 kDa) wurden aus einer cDNA-Bank des zentralen Nervensystems kloniert (Giuili et al., 1992; Harteneck et al., 1991).

Die NOsGC setzt Guanosintriphosphat (GTP) zu dem sekundären Botenstoff cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) um. Die Bindung von NO an die prosthetische Häm-Gruppe in der β_1 -Untereinheit aktiviert die NOsGC bis zum 250-fachen ihrer basalen Aktivität (Humbert et al., 1990; Stone und Marletta, 1994). Beide Isoformen weisen ähnliche kinetische Eigenschaften auf (Russwurm

et al., 1998). Untersuchungen an intakten Thrombozyten und Astrozyten des Cerebellums haben gezeigt, dass nanomolare Mengen von NO (1-10 nM) ausreichen, um die NOsGC zu aktivieren (Mo et al., 2004; Roy und Garthwaite, 2006). Das gebildete cGMP vermittelt viele verschiedene physiologische Effekte wie zum Beispiel die Regulation des Blutdrucks, der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, der Thrombozytenaggregation und -disaggregation, der peripheren Neurotransmission über NANC-Neurone („non-adrenergic non-cholinergic“) und der zentralen Neurotransmission im Rahmen der Langzeitpotenzierung (Buechler et al., 1994; Garthwaite, 2008; Jaffrey und Snyder, 1995; Warner et al., 1994). Dafür interagiert cGMP mit unterschiedlichen Effektoren, wie der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG), den durch cyclische Nukleotide gesteuerten Ionenkanälen und den cGMP-regulierten Phosphodiesterasen (zur Übersicht: Lucas et al., 2000).

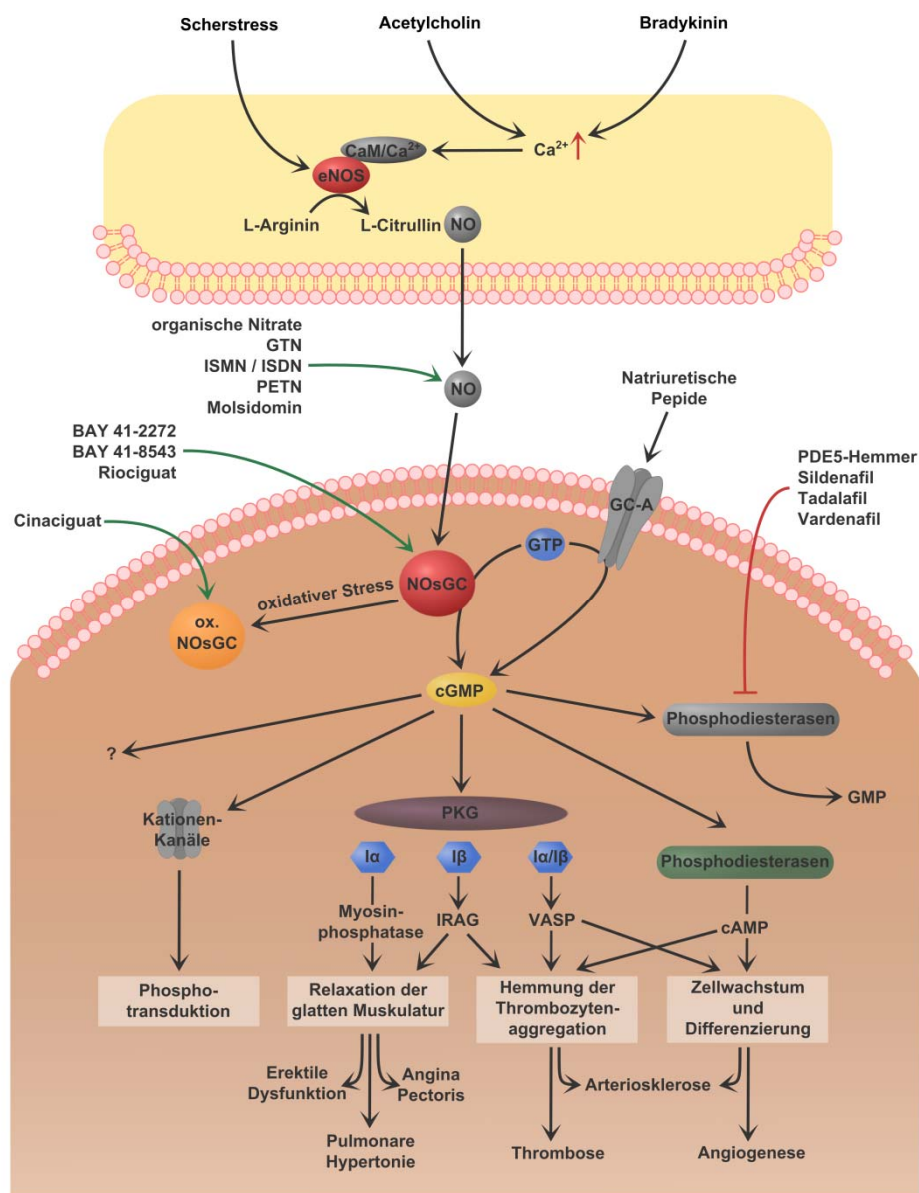


Abbildung 1: Der NO / cGMP-Signalweg

Erweitert nach Murad, 2006. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) setzt nach Aktivierung die Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und NO um. Dieses kann als lipophiles Gas über die Zellmembran in verschiedene Zielzellen diffundieren und aktiviert dort seinen intrazellulären Rezeptor, die NO-sensitive Guanylat-Cyclase (NOsGC), die GTP zu cGMP umsetzt. Die membranständige Guanylat-Cyclase (GC-A) wird durch natriuretische Peptide zur cGMP-Produktion stimuliert. Das durch den Einfluss von NO oder natriuretischen Peptiden gebildete cGMP hat verschiedenste Effekte: Es reguliert die cGMP-abhängige Proteinkinase G Ia und Ib (PKG), Phosphodiesterasen und Kationenkanäle und hat möglicherweise weitere noch nicht bekannte Funktionen. Über die PKG werden die Relaxation der glatten Muskulatur und die Hemmung der Thrombozytenaggregation vermittelt. Diese Effekte wirken sich bei der erektilen Dysfunktion, der Angina pectoris, der pulmonalen Hypertonie, bei Thrombosen und der Arteriosklerose positiv auf die Symptomatik und den Krankheitsverlauf aus. Daher werden Arzneistoffe die den NO / cGMP-Signalweg positiv beeinflussen in der Therapie eingesetzt: Organische Nitrate (bei Angina pectoris) setzen NO frei, NO-unabhängige und Häm-abhängige NOsGC-Stimulatoren wie Riociguat stimulieren die NOsGC direkt, NO- und Häm-unabhängige NOsGC-Aktivatoren wie Cinaciguat aktivieren die hämfreie NOsGC, Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE5) wie Sildenafil hemmen den Abbau von cGMP.

Die α_2 -Untereinheit wurde das erste Mal im Jahr 1991 von Harteneck et al. beschrieben. Die Autoren identifizierten die Untereinheit mit Hilfe einer cDNA Datenbank des Gehirns von menschlichen Föten (Harteneck et al., 1991). Russwurm et al. kopräzipitierten die α_2 -Untereinheit mit der β_1 -Untereinheit aus humaner Plazenta und wiesen damit die Expression in vivo nach (Russwurm et al., 1998). Die α_2 -Untereinheit wird im Gegensatz zur α_1 - und β_1 -Untereinheit nur in einigen Geweben exprimiert und konnte in besonders hohen Konzentrationen im Gehirn, in der Plazenta, in der Milz sowie im Uterus nachgewiesen werden (Budworth et al., 1999; Mergia et al., 2003). Sie weist insgesamt eine 48 %ige Sequenzhomologie mit der α_1 -Untereinheit auf. Dabei liegt der Anteil der übereinstimmenden Aminosäuren zwischen 27 % im Amino-Terminus und 87 % in den zentralen Domänen und der katalytischen Domäne im Carboxy-Terminus. Die 30 carboxy-terminalen Aminosäuren der α_2 -Untereinheit hingegen weisen keine Übereinstimmungen mit dem Carboxy-Terminus der α_1 -Untereinheit auf (Harteneck et al., 1991). Dieser carboxy-terminale Bereich der α_2 -Untereinheit hat einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation der Isoform. In Synapsen ist die α_2 / β_1 Isoform der NOsGC durch eine Interaktion ihrer fünf carboxy-terminalen Aminosäuren (Sequenz: RETSL) an die PDZ-Domäne des „post synaptic density protein“ (PSD95) an der Zellmembran lokalisiert (Russwurm et al., 2001). Die membranäre Lokalisation führt zu einer Kompartimentierung des gebildeten cGMP und damit zu einer sehr effizienten Weiterleitung des NO-Signals an membrangebundene Zielstrukturen (Bellingham und Evans, 2007). Untersuchungen eines fluoreszenzmarkierten Fusionsproteins aus α_2 - und β_1 -Untereinheit mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop deuten auf eine Lokalisation der Isoform an Zell-Zell-Kontakte hin (Haase, 2010).

Die Lokalisation der α_2 / β_1 Isoform an Synapsen, ihre starke Expression im Gehirn und Befunde, dass ein Inhibitor der NOsGC (ODQ) die NO-abhängige Langzeitpotenzierung im Hippocampus blockiert, weisen auf eine Beteiligung der Isoform an neuronalen Funktionen hin (Boulton et al., 1995). Das Ausschalten der α_1 -Untereinheit oder der α_2 -Untereinheit im Mausmodell verhindert in beiden Fällen die Langzeitpotenzierung im visuellen Cortex. Dieser Befund spricht dafür, dass beide Isoformen,

α_1 / β_1 Isoform und α_2 / β_1 Isoform, unterschiedliche physiologische Funktionen bei der Langzeitpotenzierung wahrnehmen (Haghikia et al., 2007).

1.1.3. Zielstrukturen für cGMP

Proteinkinase G (PKG)

Der Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Diese katalysiert den Transfer des γ -Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP) auf ein Serin oder Threonin eines Zielproteins. Zwei unterschiedliche Gene kodieren für zwei Typen der homodimeren PKG, Typ I und Typ II. Die lösliche PKG I hat eine molare Masse von 76 kDa und existiert in zwei Isoformen (Typ Ia und Ib). Die beiden Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen aus demselben Gen und haben unterschiedliche Amino-Termini, aber identische katalytische Domänen (Ruth et al., 1991; Tamura et al., 1996). Die Unterschiede im Amino-Terminus zwischen den beiden Isoformen der PKG I bedingen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für cGMP. Die PKG Ia besitzt eine hochaffine und eine niederaffine Bindungsstelle, die miteinander kooperieren, während die PKG Ib zwei niederaffine Bindungsstellen für cGMP aufweist (Ruth et al., 1991). Obwohl beide Isoformen auch in den gleichen Geweben exprimiert werden, kommt die PKG Ia hauptsächlich im Gefäßsystem, in der Niere und der Nebenniere vor, während die PKG Ib hauptsächlich im Uterus exprimiert wird (Tamura et al., 1996). Die PKG II hat eine molare Masse von 86 kDa und liegt membrangebunden vor. Sie wird im Gegensatz zur PKG I nicht im kardiovaskulären System exprimiert, kommt aber in großen Konzentrationen im Gehirn und im Darm vor (Jarchau et al., 1994; Uhler, 1993).

Die PKG I ist an den vielfältigen Effekten der natriuretischen Peptide im kardiovaskulären System beteiligt und ist der Hauptvermittler der NO-induzierten Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und der Thrombozytenaggregationshemmung (Lohmann et al., 1997; Massberg et al., 1999; Pfeifer et al., 1998) (siehe Abbildung 1). Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur ist auf eine Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zurückzuführen, die über vielfältige Mechanismen vermittelt wird. Zu diesen Mechanismen gehören neben Weiteren: 1. die Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Phosphorylierung des IP3-Rezeptor assoziierten Proteins (IRAG), 2. die Phosphorylierung und Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase, welche die Myosin-Leichtketten dephosphoryliert und 3. die Phosphorylierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen, deren erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit eine Hyperpolarisation der Membran und die Schließung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen auslöst (Alioua et al., 1998; Ammendola et al., 2001; Fukao

et al., 1999; Geiselhöringer et al., 2004; Komalavilas und Lincoln, 1996; Schlossmann et al., 2000; Surks et al., 1999).

Alle Proteinkinasen bestehen aus einer amino-terminalen regulatorischen Domäne und einer katalytischen Domäne. Die amino-terminale Domäne enthält fünf Regionen mit unterschiedlichen Funktionen: 1. eine Leucin / Isoleucin reiche Dimerisierungsregion, 2. eine autoinhibitorische Region, die in der Abwesenheit von cGMP die katalytische Domäne hemmt, 3. eine Region in der eine aktivitätssteigernde Autophosphorylierung stattfinden kann 4. eine Region zur Regulation der Affinität für cGMP und 5. eine Region, die Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation der PKG hat. Die regulatorische Domäne besitzt zwei cGMP-Bindungsstellen an die zwei Moleküle cGMP binden müssen, um eine vollständige Aktivierung der PKG zu erreichen. Die carboxy-terminale katalytische Domäne enthält die Bindungsstellen für den Kofaktor Mg^{2+} , ATP und das zu phosphorylierende Zielprotein (Lohmann et al., 1997).

Phosphodiesterasen (PDE)

Phosphodiesterasen (PDE) spalten cGMP und cAMP zu 5'-GMP und 5'-AMP und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der intrazellulären cGMP- und cAMP-Konzentration. Insgesamt wurden 11 unterschiedliche Familien von PDEs beschrieben, die unterschiedliche Affinitäten für cGMP und cAMP aufweisen (Bender und Beavo, 2006). PDE-Familien 1, 2, 3, 10 und 11 hydrolysieren cGMP und cAMP, während die PDE-Familien 4, 7 und 8 hauptsächlich cAMP umsetzen. Nur die PDE-Familien 5, 6 und 9 sind spezifisch für cGMP. Das Ausmaß und die Dauer des cGMP-Signals in glatten Muskelzellen werden hauptsächlich durch die cGMP-spezifische PDE 5 reguliert. Diese weist neben der Bindungsstelle für cGMP in der katalytischen Domäne eine weitere, allosterische Bindungsstelle für cGMP auf. Die Bindung von cGMP an dieser Stelle stimuliert die Phosphorylierung der PDE 5 durch die PKG und führt zu einem verstärkten Abbau von cGMP und dem Beenden des cGMP-Signals (Rybalkin et al., 2002; Shimizu-Albergine et al., 2003). Dieser durch cGMP-vermittelte negative Rückkopplungsmechanismus wird auch mit einer Desensibilisierung der PDE 5 in Verbindung gebracht (Koesling et al., 2005).

Durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG)

Durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG) haben im zytosolisch liegenden Carboxy-Terminus eine Bindungsstelle für zyklische Nukleotide (cGMP oder cAMP). Die Bindung von cGMP oder cAMP moduliert die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kationenkanäle und beeinflusst damit die Ionenkonzentration in der Zelle und das Membranpotenzial (Goulding et al., 1994). Die CNGs transportieren neben Ca^{2+} -Ionen auch K^{+} - und Na^{+} -Ionen. Sie wurden erstmals in Photorezeptoren und in olfaktorischen Rezeptorneuronen identifiziert und spielen eine zentrale Rolle bei der

Signaltransduktion des Geruchssinns und des Sehens (Kaupp und Seifert, 2002). In beiden Kaskaden sind die CNG-Kanäle membranständigen Guanylat-Cyclasen nachgeschaltet: In den Photorezeptoren wird im Dunkeln ein hoher cGMP-Spiegel durch die GC-E und GC-F (siehe 1.4) aufrechterhalten, der die CNG-Kanäle im geöffneten Zustand hält und für einen Influx von Na^+ und Ca^{2+} Ionen sorgt (Pugh et al., 1997; Yang et al., 1995). Die daraus resultierende Depolarisation der Zellmembran fördert die synaptische Freisetzung von Glutamat. Unter Einfluss von Licht als Stimulus werden Phosphodiesterasen aktiviert, die cGMP zu GMP abbauen und das Schließen der CNG-Kanäle auslösen. Im Gegensatz dazu wird in Neuronen des Geruchssinns der cGMP-Spiegel bei einem exzitatorischen Stimulus durch die Aktivierung der GC-D erhöht und die Depolarisation der Zellen durch das Öffnen von CNG-Kanälen herbeigeführt (Fulle et al., 1995; Leinders-Zufall et al., 2007).

1.2. Der NO / cGMP-Signalweg als Angriffspunkt für Arzneistoffe

Veränderungen des NO / cGMP-Signalwegs werden mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie zum Beispiel der Hypertonie, der pulmonalen Hypertonie, der Herzinsuffizienz und der koronaren Herzkrankheit sowie mit Schlaganfällen und der Arteriosklerose. Oxidativer Stress, die Beeinflussung der NO-Biosynthese durch eine Entkopplung der NOS, oder das direkte Abfangen des NO durch reaktive Sauerstoffspezies werden als mögliche Ursachen für eine gestörte Signalweiterleitung im NO / cGMP-Signalweg und als Auslöser dieser Erkrankungen angesehen. Ebenfalls diskutiert wird eine bei oxidativem Stress verminderte Expression der NOsGC und die Bildung einer oxidierten / hämfreien NOsGC, welche möglicherweise einem gesteigerten Abbau unterliegt (Evgenov et al., 2006; Kagota et al., 2006; Melichar et al., 2004; Nedvetsky et al., 2008; Stasch et al., 2006; Wedgwood et al., 2005). Da kardiovaskuläre Ereignisse wie die koronare Herzkrankheit, ein akuter Herzinfarkt und die Herzinsuffizienz zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen, sind die Therapie dieser Erkrankungen und die Entwicklung neuer Arzneistoffe von besonderer Bedeutung.

1.2.1. Zugelassene Wirkstoffe mit Angriffspunkten im NO / cGMP-Signalweg

Zu den zurzeit auf dem Markt befindlichen Wirkstoffen mit Angriffspunkt im NO / cGMP-Signalweg gehören die organischen Nitrate und die Phosphodiesterasehemmer. Aus den organischen Nitraten wird enzymatisch NO freigesetzt, das über die Aktivierung der NOsGC zu einer gesteigerten cGMP-Produktion führt. Phosphodiesterasehemmer vermindern den Abbau von cGMP.

Das organische Nitrat Glyceroltrinitrat (GTN) ist der älteste NO-freisetzende Arzneistoff. GTN wurde 1879 von William Murell zum ersten Mal für die Therapie der Angina pectoris eingesetzt und ist heute das Standardarzneimittel zur Kupierung eines akuten Angina pectoris-Anfalls (Ferreira und Mochly-Rosen, 2012; Marsh und Marsh, 2000). Zur symptomatischen Langzeittherapie der koronaren Herzkrankheit werden langwirksame Nitrate wie Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN) und das am häufigsten eingesetzte Pentaerythryltetranitrat (PETN) sowie das Sydnonimin-Derivat Molsidomin verwendet. Die Wirkung von GTN bei der Angina pectoris beruht auf der Dilatation der großen venösen Kapazitätsgefäße, die zu einer Senkung der kardialen Vorlast führt. Durch den geringeren enddiastolischen Druck und die verringerte Wandspannung des Myokards wird die Durchblutung von kritischen Myokardarealen verbessert (Torfgard und Ahlner, 1994). Alle organischen Nitrate zeigen als unerwünschte Nebenwirkung besonders zu Beginn der Therapie das Auftreten von Kopfschmerzen („Nitratkopfschmerz“) (Bagdy et al., 2010). Eine wiederholte Gabe führt schnell zu einer Toleranzentwicklung (Lehmann et al., 1995). Zur Vermeidung der Toleranz muss ein nitratfreies Intervall eingehalten werden (Thadani, 1992).

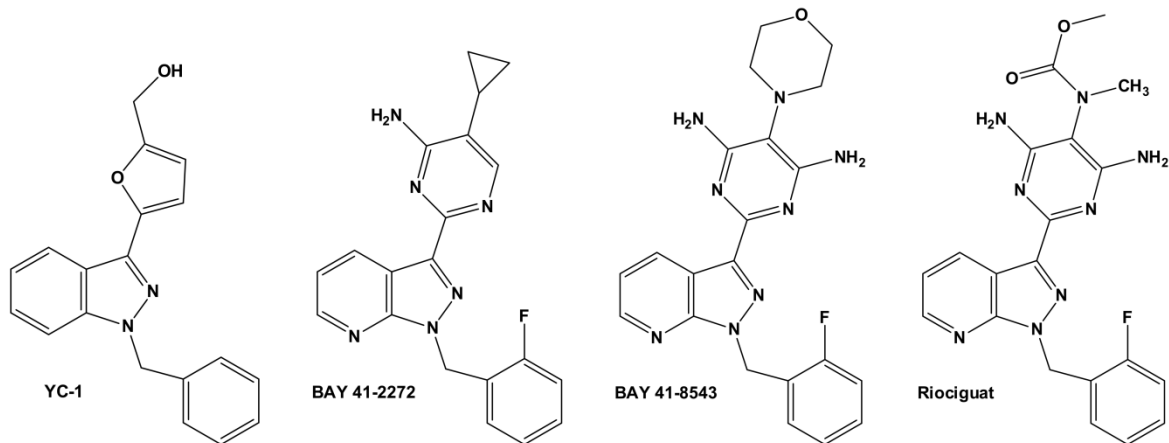
Für die Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie und der erektilen Dysfunktion sind die Phosphodiesterase 5-Hemmer Sildenafil und Tadalafil zugelassen, während Vardenafil nur eine Zulassung für die erektile Dysfunktion hat (Galie et al., 2009; Galie et al., 2005; Shamloul und Ghanem, 2013). Die pulmonale arterielle Hypertonie ist durch einen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf gekennzeichnet und ist eine lebensbedrohliche chronische Krankheit. Todesursachen sind progredientes Rechtsherzversagen und Arrhythmien (Montani et al., 2013). Durch die kompetitive Hemmung der Phosphodiesterase 5 wird der Abbau von cGMP verhindert und es kommt zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen der Lungengefäße.

1.2.2. NOsGC-Stimulatoren

Da die organischen Nitrate Nachteile vor allem in der Langzeittherapie aufweisen, besteht besonderes Interesse daran alternative Arzneistoffe zu entwickeln, welche die NOsGC direkt aktivieren können. Der erste identifizierte Stimulator der NOsGC ist das Benzylindazol-Derivat YC-1, das als Leitstruktur für die Entwicklung hochpotenter und spezifischer Stimulatoren diente (Friebe et al., 1996; Ko et al., 1994; Mulsch et al., 1997). Diese Entwicklung brachte zwei Pyrazolpyridin-Derivate mit höherer Potenz und Spezifität für die NOsGC hervor: BAY 41-2272 und BAY 41-8543 (Stasch et al., 2002a; Stasch et al., 2001; Straub et al., 2001) (Abbildung 2). BAY 41-2272 stimuliert die NOsGC um das 20-fache, während BAY 41-8543 die NOsGC um das 92-fache stimuliert (Stasch et al., 2002a; Stasch et al., 2001). YC-1 und seine Derivate BAY 41-2272, BAY 41-8543 stimulieren die NOsGC unabhängig von NO, aber agieren auch synergistisch mit NO und CO (Friebe et al., 1996; Hoenicka et

al., 1999; Hu et al., 2008). Ihr stimulierender Effekt hängt von der Anwesenheit der reduzierten Häm-Gruppe in der β_1 -Untereinheit der NOsGC ab. Die Weiterentwicklung dieser Substanzen unter Berücksichtigung der pharmakokinetischen Eigenschaften und einem geringen CYP-Interaktionspotenzial führte zu dem NOsGC-Stimulator Riociguat (BAY 60-2521) (Mittendorf et al., 2009). Dieser stimuliert die NOsGC bis zum 73-fachen ihrer basalen Aktivität und in Kombination mit NO bis zum 112-fachen der basalen Aktivität (Schermuly et al., 2008).

NOsGC Stimulatoren



NOsGC Aktivatoren

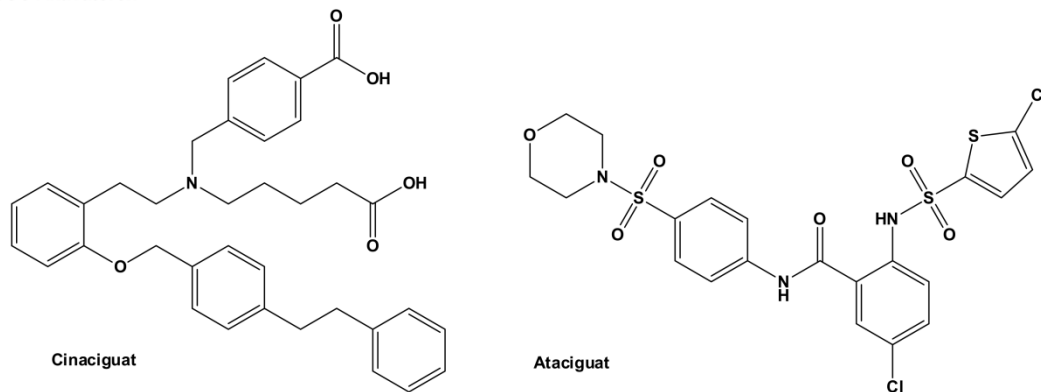


Abbildung 2: Strukturen der NOsGC-Stimulatoren und Aktivatoren

YC-1 diente als Leitstruktur für die Entwicklung hochpotenter und spezifischer NOsGC-Stimulatoren. Für Riociguat wurde 2013 die Zulassung beantragt. Cinaciguat und Ataciguat aktivieren die NOsGC unabhängig von NO und der Häm-Gruppe. Cinaciguat imitiert Häm in der Häm-Bindetasche.

Die Bindungsstelle der Stimulatoren wurde noch nicht eindeutig identifiziert und auch der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Die Untersuchungen von Pal et al. 2010 und Hu et al. 2008 sprechen dafür, dass YC-1 an den Amino-Terminus der α_1 -Untereinheit der NOsGC bindet und dort zu einer Änderung der Konformation führt (Hu et al., 2008; Pal und Kitagawa, 2010). Mit Hilfe von Photolabeling-Untersuchungen identifizierten Stasch et al. 2001 die Cysteine 238 und 243 der α_1 -Untereinheit als Bindungsstelle für die NOsGC-Stimulatoren (Stasch et al., 2001). Koglin und

Behrends zeigten hingegen, dass die ersten 259 Aminosäuren der α_1 -Untereinheit (α_1 AN259 / β_1) ohne Verlust der Sensitivität gegenüber NO oder YC-1 deletiert werden können (Koglin und Behrends, 2003). Andere Arbeitsgruppen postulierten aufgrund von Mutationsstudien, dass sich die Bindestelle im carboxy-terminalen Teil der α_1 -Untereinheit innerhalb der sogenannten pseudosymmetrischen Bindetasche befindet (Friebe et al., 1999; Lamothe et al., 2004). Verschiedene weitere Studien zeigten, dass die NOsGC-Stimulatoren in Anwesenheit von NO oder CO die Hämgeometrie beeinflussen oder zu einer Verformung der Häm-Bindetasche führen (Denninger et al., 2000; Ibrahim et al., 2010; Makino et al., 2003; Yoo et al., 2012). Sie sprechen für eine mögliche Bindungsstelle der NOsGC-Stimulatoren in der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit. Die teilweise widersprüchlichen Untersuchungen lassen derzeit keine klare Aussage zur Bindungsstelle und zum Wirkmechanismus der NOsGC-Stimulatoren zu.

Im Tiermodell weisen die Wirkungen der NO-unabhängigen Stimulatoren der NOsGC auf vielfältige Einsatzmöglichkeiten als Arzneistoffe hin: Sie senken den Blutdruck und erhöhen die Überlebensrate hypertensiver Ratten (Stasch et al., 2001; Stasch et al., 2002b). Außerdem führen sie zu einer pulmonalen Vasodilatation und zu verringerten Umbauprozessen der Gefäße („remodelling“) sowie einer verminderten Rechtsherzhypertrophie bei pulmonaler Hypertonie (Deruelle et al., 2006; Evgenov et al., 2004; Freitas et al., 2007). Zusätzlich hemmen die Stimulatoren die Thrombozytenaggregation und sie vermitteln eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulzellen im Corpus cavernosum bei der erektilen Dysfunktion (Mizusawa et al., 2002; Nakane et al., 2002; Stasch et al., 2002a; Stasch et al., 2001; Stasch et al., 2002b; Tulis et al., 2002).

Von den beschriebenen NO Stimulatoren wurde nur Riociguat aufgrund seines guten Sicherheitsprofils vom Tiermodell in klinische Studien übernommen (Frey et al., 2008). Riociguat hat bereits die Phase III der klinischen Studien für die Indikation pulmonale arterielle Hypertonie durchlaufen (Mai 2012 abgeschlossen). Die Firma Bayer hat Anfang 2013 die Zulassung bei der Food and drug administration beantragt.

1.2.3. NOsGC-Aktivatoren

Mit Hilfe einer Hochdurchsatzsuche von 250000 Substanzen wurde von der Firma Bayer eine neue Klasse von NOsGC-Aktivatoren entdeckt, aus der nach chemischer Optimierung Cinaciguat (BAY 58-2667) als potenzieller Arzneistoff hervorging (Stasch et al., 2002c). Parallel dazu wurde bei Sanofi-Aventis Ataciguat als Aktivator der NOsGC identifiziert, der einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Cinaciguat ausweist (Schindler et al., 2006). Im Gegensatz zu den NOsGC-Stimulatoren ist die Aktivierung der NOsGC durch NOsGC-Aktivatoren unabhängig von der Häm-Gruppe. Das Entfernen

der Häm-Gruppe mit Detergenzien oder die Oxidation des zentralen Eisenatoms zu Fe^{3+} durch den NOsGC Inhibitor ODQ verstärkt den aktivierenden Effekt von Cinaciguat erheblich (Stasch et al., 2002c). Mit Hilfe der Kristallstruktur der HNOX-Domäne von *Nostoc sp. PCC 7120*, in der die Häm-Gruppe entfernt und Cinaciguat zugesetzt wurde, zeigten Martin et al. 2010, dass Cinaciguat die Häm-Gruppe ersetzt und als ein Häm-Mimetikum agiert. Die Carboxyl-Gruppen interagieren dabei wie die Propionat-Gruppen des Häms während die hydrophoben Phenylringe planar in der Häm-Bindetasche liegen (Martin et al., 2010) (siehe Abbildung 2). Der NOsGC-Aktivator imitiert demnach die Häm-Gruppe und führt so zu einer NO- und hämunabhängigen Aktivierung der NOsGC bis zum 37-fachen der basalen Aktivität (Stasch et al., 2002c). Dabei ist bisher unklar, ob Cinaciguat nur an die hämfreie NOsGC bindet, ob die Substanz zusätzlich an das oxidierte Enzym bindet und ob sie in hohen Konzentrationen ($> 100 \mu\text{M}$) die Häm-Gruppe aus dem intakten Enzym verdrängen kann (Roy et al., 2008; Schmidt et al., 2004; Stasch et al., 2002c). Cinaciguat führt in vitro und in vivo zu einer Vasodilatation und einer Thrombozytenaggregationshemmung und zeigt keine Beeinflussung dieser Effekte bei einer durch organische Nitrate induzierten Toleranzentwicklung (Stasch et al., 2002c). Der Wirkstoff stellt demnach eine Alternative für die Therapie mit den organischen Nitraten dar. In klinischen Studien an Patienten mit akuter dekompensierter Herzinsuffizienz führte Cinaciguat dosisabhängig zu einer Senkung der Vor- und Nachlast des Herzens, einem erhöhten Herzzeitvolumen, einer verstärkten renalen Durchblutung und einer verbesserten Nierenfunktion. In Phase IIb und Phase III Studien mit Cinaciguat müssen allerdings noch ausreichend Daten zur Wirksamkeit und Sicherheit erbracht werden (zur Übersicht: Tamargo et al., 2010).

1.3. Domänenorganisation der NOsGC

Die beiden Untereinheiten der NOsGC, α und β , sind homolog aufgebaut und weisen besonders im carboxy-terminalen Bereich hohe Sequenzübereinstimmungen auf (Koesling et al., 1990). Sie bestehen jeweils aus einer carboxy-terminalen katalytischen Domäne, aus den hauptsächlich für die Dimerisierung verantwortlichen coiled-coil Domänen und PAS-Domänen sowie aus der amino-terminalen regulatorischen HNOX-Domäne (Abbildung 3). In der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit ist die prosthetische Häm-Gruppe gebunden. Bisher sind nur die Kristallstrukturen der einzelnen Domänen von Homologen der NOsGC bekannt (Ma et al., 2010; Ma et al., 2008; Ma et al., 2007; Martin et al., 2010; Olea et al., 2008; Purohit et al., 2013; Winger et al., 2008). Es ist noch nicht gelungen die NOsGC vollständig zu kristallisieren, daher ist auch die Anordnung der Domänen zueinander unbekannt (Abbildung 4).

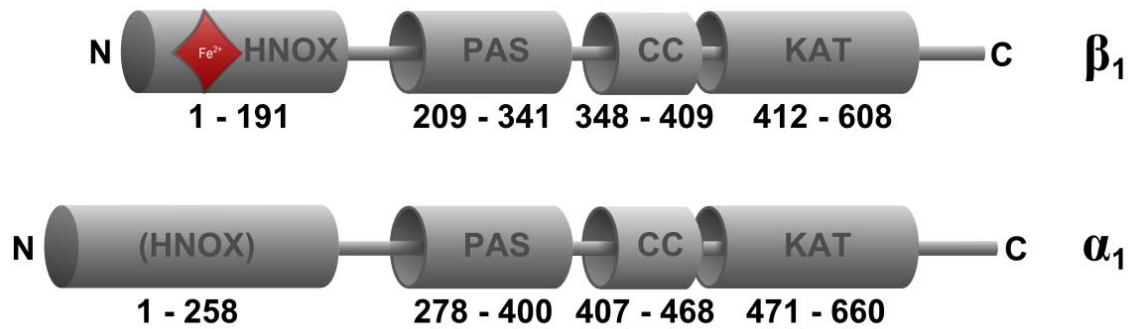


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der NOSGC-Untereinheiten

Die NOSGC besteht aus vier Domänen: der Häm-bindenden Domäne (HNOX), der PAS-Domäne, der coiled-coil Domäne und der katalytischen Domäne. NO bindet an die Häm-Gruppe (dargestellt als rote Raute) und steigert die Umsetzung von GTP zu cGMP in der katalytischen Domäne. Die Angaben der Bereiche der Domänen basieren auf der kristallisierten Region der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit von Martin et al., 2010 (*Nostoc sp. PCC 7120*), auf der kristallisierten Region der PAS-Domäne von Ma et al., 2008 (STHK aus *Nostoc punctiforme*, die homolog zur zentralen Region der NOSGC ist), auf der kristallisierten Region der coiled-coil Domäne von Ma et al., 2010 (NOSGC β_1 -Untereinheit aus der Ratte) und auf der kristallisierten Region der katalytischen Domäne von Winger et al., 2008 (NOSGC, katalytische Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii*). Die eingeklammerte HNOX-homologe Domäne der α_1 -Untereinheit ist nicht in die Häm-Bindung und die Aktivierung durch NOSGC-Stimulatoren wie YC1 eingebunden (Koglin und Behrends, 2003).

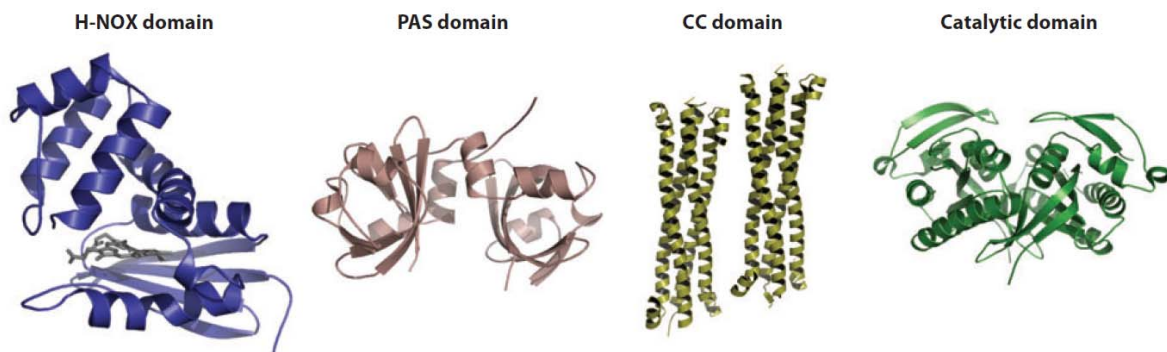


Abbildung 4: Kristallstrukturen der einzelnen NOSGC Domänen

Aus Derbyshire und Marletta, 2012. Bisher sind nur die Kristallstrukturen der einzelnen Domänen von Homologen der NOSGC bekannt. Es ist noch nicht gelungen die NOSGC vollständig zu kristallisieren; daher ist auch die Anordnung der Domänen zueinander unbekannt. Die gezeigten Kristallstrukturen sind die HNOX-Domäne von *T. tengcongensis* (PDB 1U55), die dimere PAS-Domäne von *N. punctiforme* PCC 73102 (PDB 2p04), die coiled-coil Domäne der β_1 -Untereinheit der Ratte (PDB 3hls) und die homodimere katalytische Domäne aus *C. reinhardtii* (PDB 3et6).

1.3.1. HNOX-Domäne

Am Amino-Terminus der β_1 -Untereinheit befindet sich die 194 Aminosäuren lange, hämbindende Domäne (HNOX) (Karow et al., 2005). In ihr ist die prosthetische Häm-Gruppe mit einem zweiwertigen Eisen als Zentralatom lokalisiert und sie bildet die Bindungsstelle für NO. Die Häm-

Gruppe führt zu einem charakteristischen Absorptionsmaximum der NOsGC bei 431 nm im UV/Vis-Absorptionsspektrum (Soret-Bande), welches sich nach der Anlagerung von NO zu 399 nm verschiebt. Das Häm ist über das zentrale Eisenatom an das Histidin 105 der β_1 -Untereinheit als axialer Ligand gebunden, sowie über seine Propionsäure-Seitenketten an die angrenzenden Aminosäuren Tyrosin 135, Serin 137 und Arginin 139 komplexiert (Schmidt et al., 2004; Wedel et al., 1994; Zhao et al., 1998). Der Austausch des Histidins gegen Alanin oder Phenylalanin führt zur Expression einer hämfreien NOsGC, die nicht mehr durch NO aktiviert werden kann (Wedel et al., 1994; Zhao et al., 1998). Der einleitende Schritt für die Aktivierung der NOsGC ist die diffusionskontrollierte Bindung von NO an die Häm-Gruppe in der β_1 -Untereinheit, die zum Bruch der Bindung zwischen dem Häm-Eisen und dem Histidin 105 führt (Stone und Marletta, 1994). Dabei bildet sich zunächst ein sechsfach-koordinierter Nitrosyl-Häm-Komplex, welcher dann schnell in einen fünffach-koordinierten Komplex übergeht (Stone und Marletta, 1996). Kristallstrukturen von Homologen der HNOX-Domäne deuten darauf hin, dass die Bindung von NO eine starke Verdrehung des Häms und der Häm-Tasche auslöst, die mit einer umfangreichen Konformationsänderung des Amino-Terminus der HNOX-Domäne einhergeht (Ma und Wang, 2007; Olea et al., 2008). Außerdem konnten Martin et al. 2010 zeigen, dass es zu einer Verschiebung des carboxy-terminalen Teils der β_1 -HNOX-Domäne, im Besonderen der αF Helix, kommt, wenn der hämunabhängige NOsGC-Aktivator Cinaciguat an die NOsGC bindet (Martin et al., 2010). Martin et al. vermuten, dass die Verschiebung dieser Helix in die Weiterleitung der durch NO ausgelösten Konformationsänderung an die anderen Domänen der NOsGC involviert ist. Underbakke et al. zeigten kürzlich, dass dieser carboxy-terminale Teil der β_1 -HNOX-Domäne mit der αF Helix im direkten Kontakt zur PAS-Domäne steht und bekräftigen damit die Befunde zur Weiterleitung des Aktivierungssignals an nachgeschaltete Domänen (Underbakke et al., 2013).

Neben NO bindet auch CO an die prosthetische Häm-Gruppe der β_1 -Untereinheit. Die Bindung von CO führt jedoch im Gegensatz zur Bindung von NO nur zu einer 4-fachen Stimulation der NOsGC-Aktivität (Kharitonov et al., 1995; Stone und Marletta, 1994). Dabei bildet sich ein 6-fach koordinierter Hämkomplex aus, in dem die Bindung des Häms zum Histidin 105 bestehen bleibt. Dieser weist ein Absorptionsmaximum bei 421 nm auf. Endogen entsteht CO beim Abbau von Häm durch die Hämoxygenase zu Biliverdin und Eisen unter Verbrauch von NADPH und Sauerstoff (Maines, 1997). Bisher ist unklar welche physiologische Bedeutung die Bindung von CO an die NOsGC hat. Da die Aktivität der CO-gebundenen NOsGC durch NOsGC-Stimulatoren wie YC-1 bis zur Aktivität der NO-gebundenen Form gesteigert werden kann (Friebe et al., 1996; Hoenicka et al., 1999; Stone und Marletta, 1998), wurde die Hypothese aufgestellt, dass endogene YC-1 ähnliche Substanzen existieren (Boehning und Snyder, 2003).

1.3.2. PAS-Domäne

Die PAS-Domäne (Per-Arnt-Sim), insbesondere der β_1 -Untereinheit, spielt eine entscheidende Rolle bei der Heterodimerisierung der beiden Untereinheiten (Rothkegel et al., 2007; Zhou et al., 2004). Ma et al. lösten 2008 die Kristallstruktur einer der NOsGC verwandten PAS-Domäne einer Histidinkinase (STHK, „Signal transduction histidin kinases“) und entwickelten ein Modell der PAS-Domäne in der NOsGC (Ma et al., 2008). Kürzlich erschienene Studien zeigen, dass die PAS-Domäne in direktem Kontakt zur HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit steht und daher möglicherweise an der Signalweiterleitung von der HNOX-Domäne an die katalytische Domäne beteiligt ist (Fritz et al., 2013; Purohit et al., 2013; Underbakke et al., 2013). Eine zentrale Rolle der α_1 -PAS-Domäne bei der Aktivierung der NOsGC wurde von Koglin und Behrends 2003 bereits vermutet. Sie zeigten, dass die α_1 -PAS-Domäne (Aminosäuren 259-364) im Gegensatz zur α_1 -HNOX-Domäne notwendig für Aktivierung der NOsGC durch NO und den Stimulator YC-1 ist (Koglin und Behrends, 2003).

1.3.3. Coiled-coil Domäne

Zwei Jahre nach der Publikation der Kristallstruktur der PAS-Domäne veröffentlichte Ma et al 2010 die Kristallstruktur der coiled-coil Domäne der NOsGC β_1 -Untereinheit (Ma et al., 2010). Diese besteht demnach aus einer langen αA -Helix gefolgt von einer zweiten kurzen αB -Helix. In verschiedenen Signalproteinen, wie zum Beispiel Histidinkinasen, übernehmen coiled-coil Domänen die Weiterleitung von Aktivierungssignalen an nachgeschaltete Domänen und fungieren als Signalthelix (Anantharaman et al., 2006). Allerdings ist noch nicht aufgeklärt, welche dynamischen Konformationsänderungen sich nach der Aktivierung durch NO in dieser Region der NOsGC abspielen. Als gesichert gilt, dass die coiled-coil Domäne eine entscheidende Rolle bei der Heterodimerisierung der beiden Untereinheiten spielt (Wagner et al., 2005; Zhou et al., 2004). Deletionsstudien grenzten den für die Heterodimerisierung entscheidenden Bereich der coiled-coil Domäne auf die Aminosäuren 420-454 bzw. 440-459 der amphipathischen Helix (αA) ein (Rothkegel et al., 2007; Shiga und Suzuki, 2005). Die Aminosäuren der zweiten kurzen Helix (αB) hatten Rothkegel et al. bereits 2007 mit Hilfe von Deletionsstudien der α_1 -Untereinheit als wichtig für die NOsGC-Aktivierung identifiziert. Die Deletion der Aminosäuren 460-469 der α -Untereinheit, die der Deletion der gesamten kurzen Helix αB der coiled-coil Domäne entspricht, führte zu einem Verlust der Enzymaktivität. Die Fähigkeit zur Dimerisierung der beiden Untereinheiten blieb jedoch bestehen (Rothkegel et al., 2007).

1.3.4. Katalytische Domäne

Die katalytische Domäne besteht aus den carboxy-terminalen Aminosäuren 476-690 der α_1 -Untereinheit und den Aminosäuren 414-619 der β_1 -Untereinheit (Winger und Marletta, 2005). Um katalytisch aktiv zu sein, muss diese Domäne als Heterodimer vorliegen, da beide Untereinheiten jeweils entscheidende Aminosäuren für die Bindung von GTP und die enzymatische Reaktion bereitstellen (Abbildung 5). Ein basischer Aminosäurerest in der Substratbindestelle fungiert als Protonenakzeptor für den leicht aciden Wasserstoff der Hydroxylgruppe an der 3'-Position des Riboserings. Er begünstigt dadurch einen nukleophilen Angriff des α -Phosphats durch den Sauerstoff der Hydroxylgruppe und führt zur Bildung von cGMP und Pyrophosphat (Senter et al., 1983).

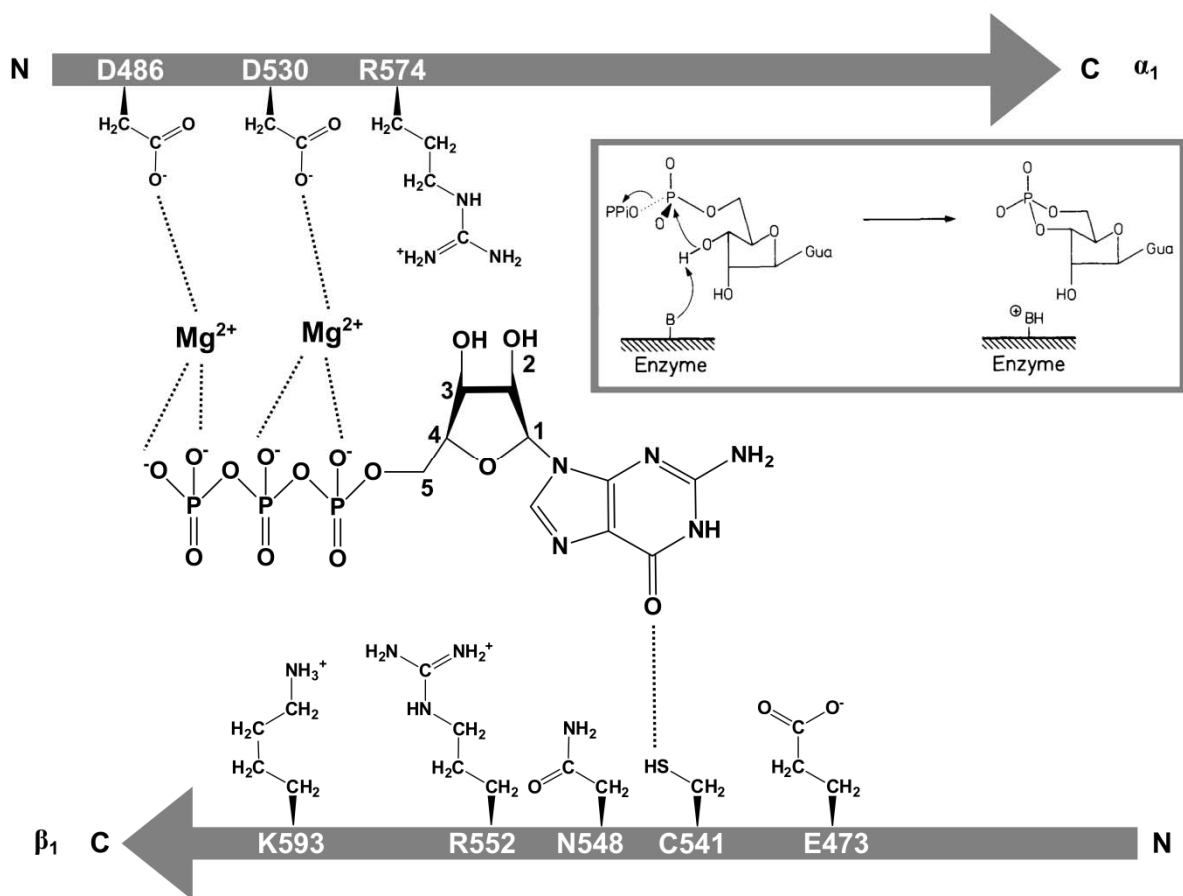


Abbildung 5: Schematische Darstellung der GTP-Bindung in der katalytischen Domäne

Nach Allerston et al., 2013 und Liu et al., 1997. Von beiden Untereinheiten werden konservierte Aminosäuren für die Bindung, Orientierung und Umsetzung des Substrats GTP bereitgestellt. β_1 N548 ist an der Bindung des Riboserings beteiligt; β_1 C541 und β_1 E473 sind entscheidend für die Diskriminierung zwischen Adenin und Guanin; β_1 R552, β_1 K593 und α_1 R574 binden an das Triphosphat von GTP; α_1 D486 und α_1 D530 orientieren zwei Magnesiumionen, deren positive Ladung der negativen Ladung der Phosphatreste gegenüber steht (humane Nummerierung). **Einfügung** Mechanismus der Katalyse aus Senter et al., 1983.

Der Vergleich der Kristallstrukturen der katalytischen Domäne der NOsGC aus *Chlamydomonas reinhardtii* und der humanen heterodimeren katalytischen Domäne mit der katalytischen Domäne der Adenylat-Cyclase lassen eine große strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Domänen vermuten (Allerston et al., 2013; Winger et al., 2008). Die Autoren schlossen daher auf einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus. Darüber hinaus sind die Informationen über Konformationsänderungen während der Aktivierung der NOsGC begrenzt. Daher ist unklar, wie das Aktivierungssignal von der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit im Amino-Terminus auf die katalytische Domäne im Carboxy-Terminus übertragen wird.

1.4. Membranständige Guanylat-Cyclasen als Vorbild für den Aktivierungsmechanismus der NOsGC

Der Botenstoff cGMP wird nicht nur durch die zytosolische und membranassoziierte NO-sensitive Guanylat-Cyclase gebildet, sondern auch durch membranständige Guanylat-Cyclasen. Von dieser zweiten Familie von Guanylat-Cyclasen gibt es sieben verschiedene Mitglieder. Dazu gehören die natriuretischen Peptid-spezifischen Guanylat-Cyclasen (GC-A und GC-B), der hitzestabile Enterotoxin-Rezeptor (GC-C), die retinalen Guanylat-Cyclasen (GC-E, GC-F) und die bisher noch weniger gut untersuchten Guanylat-Cyclasen GC-D und GC-G. Alle sieben membrangebundenen Guanylat-Cyclasen haben eine amino-terminale, extrazelluläre Domäne (ECD), eine Transmembrandomäne, eine Proteinkinase-ähnliche Domäne und eine carboxy-terminale katalytische Domäne an welcher GTP zu cGMP umgesetzt wird. Die GC-Domänen haben eine geringe basale Aktivität, die durch die Bindung des jeweiligen Liganden an die Aktivierungsdomäne zu einem starken Anstieg der cGMP-Produktion führt. Die Aktivierungsdomäne ist dabei entweder die ECD (bei GC-A, GC-B, GC-C, GC-D, GC-G) oder ein separates aber assoziiertes Protein (GCAP bei GC-E und GC-F) (zur Übersicht: Potter, 2011).

Die Funktionen der verschiedenen membranständigen Guanylat-Cyclasen sind vielfältig: Die GC-D wurde in den olfaktorischen Sensorneuronen von Ratten beschrieben und ist an der sozial vermittelten Präferenz für bestimmte Nahrung bei Mäusen beteiligt (Fulle et al., 1995; Munger et al., 2010). Die GC-E und GC-F tragen entscheidend zum Sehvorgang bei, indem sie den intrazellulären cGMP-Spiegel in Photorezeptoren wieder herstellen, der durch den Einfluss von Licht abgesenkt wird (Pugh et al., 1997; Yang et al., 1995). Die GC-C ist der Rezeptor für die endogenen Peptide Guanylin und Uroguanylin und für das hitzestabile Enterotoxin, welches cGMP-vermittelt eine wässrige Diarrhö verursacht (Currie et al., 1992; de Sauvage et al., 1991; Hamra et al., 1993; Schulz et al., 1990). Neben der Möglichkeit die GC-C als Zielstruktur für anti-sekretorische Arzneistoffe zur Behandlung der

Diarrhö zu nutzen wird sie auch als mögliche Zielstruktur für die Behandlung von Kolonkarzinomen in Betracht gezogen (Pitari et al., 2001; Zhang et al., 1999).

Die am besten untersuchte membranständige Guanylat-Cyclase ist die natriuretische Peptid-spezifische Guanylat-Cyclase (GC-A). Diese homodimere Guanylat-Cyclase wird durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das homologe B-Typ natriuretische Peptid (BNP) aktiviert. Beides sind kardiale Hormone. Die GC-A vermittelt eine Vasodilatation, eine Stimulation der Natriurese und der Diurese, führt zur Blutdrucksenkung sowie zur Verringerung des Blutvolumens. Das in den Vorhöfen gebildete ANP agiert dabei als Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), verhindert eine kardiale Hypertrophie und Fibrose und ist in das Remodelling von Herz und Gefäßen involviert (Itoh et al., 1990; Kilic et al., 2007; Lopez et al., 1995; Oliver et al., 1997). BNP wird hauptsächlich in den Ventrikeln gebildet und übernimmt ähnliche Funktionen wie das ANP (Nakao et al., 1992). Die natriuretischen Peptide binden an die extrazelluläre Domäne (ECD) der GC-A. Mit Hilfe der Kristallstruktur der ECD mit und ohne gebundenem ANP konnte gezeigt werden, dass diese Bindung eine Rotation der beiden Untereinheiten der ECD auslöst (Ogawa et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Misono postulierte, dass diese Rotation durch die transmembranären Helices eine Reorientierung der beiden intrazellulären Domänen auslöst und diese in ihre aktive Konformation bringt (Abbildung 6) (Misono et al., 2005; Misono et al., 2011; Ogawa et al., 2004; Qiu et al., 2004). Das Aktivierungssignal der GC-A wird demnach von der amino-terminalen Domäne systematisch an die nachfolgenden Domänen weitergegeben und erreicht schließlich die carboxy-terminale katalytische Domäne. Eine lineare Übertragung des Aktivierungssignals wurde in Analogie dazu auch für die NOsGC angenommen. Demnach soll das Aktivierungssignal, dass durch die Bindung von NO an die amino-terminale Häm-Gruppe in der HNOX-Domäne ausgelöst wird, über die PAS- und coiled-coil Domänen an die carboxy-terminale katalytische Domäne übertragen werden (Padayatti et al., 2004). Dieses lineare Modell der NO-Aktivierung wurde durch Ergebnisse in Frage gestellt, die eine direkte Interaktion zwischen der amino-terminalen HNOX-Domäne und der carboxy-terminalen katalytischen Domäne belegen (Winger und Marletta, 2005). Darüber hinaus konnte mit Hilfe von mit Fluoreszenzproteinen markierten Untereinheiten und Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer eine räumliche Nähe des Amino-Terminus und des Carboxy-Terminus nachgewiesen werden (Haase et al., 2010c). Allerdings führte die Fusion der HNOX-Domäne von β_1 mit den Fluoreszenzproteinen zu einem Verlust des Hämbindungsvermögens und damit zu einem nicht NO-responsiven Enzym. Für weitere Untersuchungen zu NO-stimulierten Konformationsänderungen der vollständigen NOsGC eignet sich dieses System dementsprechend nicht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Ansatz gesucht, um neue Erkenntnisse über den Aktivierungsmechanismus und die Signaltransduktion innerhalb der NOsGC zu gewinnen. Der gewählte Ansatz beruht auf der Verwendung der natürlich vorkommenden Tryptophane als FRET-Donatoren, indem fluoreszierende, substratanaloge Nukleotide als FRET-Akzeptoren eingesetzt wurden.

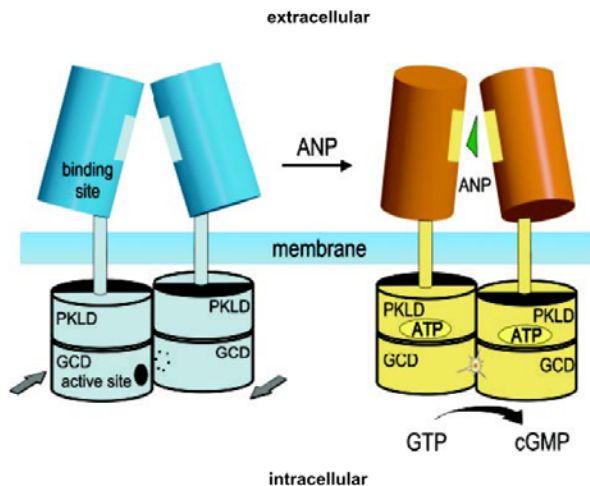


Abbildung 6: Postulierter Aktivierungsmechanismus der GC-A

Aus Ogawa et al., 2004. Die Bindung von ANP verursacht eine Rotation der extrazellulären Domäne. Diese Rotation wird durch die transmembranären Helices an die intrazellulären Domänen weiter gegeben und orientiert diese um. Wenn ATP an die Proteinkinase-ähnliche Domäne (PKLD) gebunden ist, werden dabei die zwei aktiven Zentren der Guanylat-Cyclase Domäne (GCD) in eine für die Katalyse optimale Position gebracht.

1.4.1. Fluoreszierende Nukleotide

(N-methyl)anthraniloyl-substituierte Nukleotide (Mant-NTPs) sind fluoreszenzmarkierte Nukleotide, die mit GTP oder ATP um die Substratbindestelle von Adenylat- und Guanylat-Cyclasen konkurrieren (Gille et al., 2004; Gille und Seifert, 2003) (Abbildung 7). Mant-Nukleotide können für Tyrosine und Tryptophane in Proteinen als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) Akzeptoren dienen, wenn diese mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt werden. Zusätzlich müssen sich die Fluorophore, bedingt durch die Konformation des Proteins, in räumliche Nähe befinden. Infolgedessen können FRET-Messungen genutzt werden, um durch die Aktivierung verursachte Konformationsänderungen in gereinigten Proteinen zu untersuchen, wenn die sich bewegenden Domänen Tyrosine und Tryptophane enthalten. Mou et al. zeigten dies am Beispiel einer Säugetier Adenylat-Cyclase, Göttel et al. am Beispiel des Calmodulin-abhängigen Adenylat-Cyclase Toxins aus *Bordetella pertussis* und Suryanarayana et al. verwendeten den Calmodulin-abhängigen Adenylat-Cyclase Toxin Edema Faktor (Göttel et al., 2007; Mou et al., 2005; Mou et al., 2006; Suryanarayana et al., 2009). Zusätzlich zum FRET mit Tyrosinen und Tryptophanen liefert die Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe bei direkter Anregung Informationen über die Polarität ihrer Umgebung. Je hydrophober die Umgebung ist, desto stärker fluoresziert die Mant-Gruppe (Hiratsuka, 1983). Die Messungen der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe lieferten daher Informationen über den Zustand der katalytischen Domäne und der Substratbindetasche. Zum Beispiel zeigten Mou et al. 2005, dass sich die Lipophilie der Substratbindetasche in der katalytischen Domäne der Adenylat-Cyclase durch den Aktivator Forskolin erhöht. Für die NOsGC wurden Mant-Nukleotide bisher als Inhibitoren und in der Aktivitätsbestimmung als Alternative zur Bestimmung der Aktivität mit radioaktiv markiertem cGMP verwendet (Gille et al., 2004; Newton et al., 2010). Bisher gibt es jedoch keine Daten zu FRET-Messungen und Messungen der Eigenfluoreszenz der an die NOsGC gebundenen Mant-Gruppe.

Mant-Nukleotide sind als unterschiedliche Derivate kommerziell erhältlich. Die Mant-Gruppe kann dabei an der 2'- und der 3'-OH-Gruppe des Riboserings des jeweiligen Nukleotids gebunden vorliegen. Bei den Derivaten 2'-Mant-3'-dGTP und 3'-Mant-2'-dGTP ist die Mant-Gruppe entweder an der 2'-OH-Gruppe oder an der 3'-OH-Gruppe des Riboserings gebunden (Jameson und Eccleston, 1997). Der Ribosering ist dabei an der jeweiligen anderen Position dehydroxyliert. Beim nicht dehydroxylierten Derivat Mant-GTP findet eine Isomerisierung der Mant-Gruppe zwischen der 2'- und 3'-OH-Gruppe des Riboserings statt (Abbildung 7).

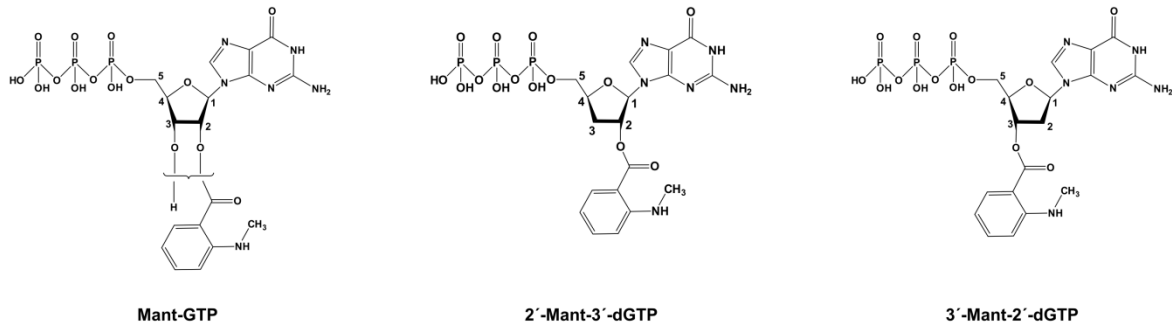


Abbildung 7: Strukturen der verfügbaren Mant-dGTP Derivate

Bei den Derivaten 2'-Mant-3'-dGTP und 3'-Mant-2'-dGTP ist die Mant-Gruppe entweder an der 2'-OH-Gruppe oder an der 3'-OH-Gruppe des Riboserings gebunden, der an der jeweiligen anderen Position dehydroxyliert ist. Im Gegensatz zu den Mant-Gruppen von 2'-Mant-3'-dGTP und 3'-Mant-2'-dGTP kann die Mant-Gruppe im Mant-dGTP zwischen der 2'- und der 3'-Position isomerisieren.

Aus folgenden Gründen wurde für diese Arbeit das 2'-Mant-3'-dGTP-Derivat verwendet: Die auftretende Isomerisierung der Mant-Gruppe im Mant-GTP erschwert möglicherweise die Übertragung der Energie der Indolylfunktion der Tryptophane auf die Mant-Gruppe und erklärt den fehlenden Energietransfer bei der Verwendung dieses Derivats (Göttle et al., 2007). 3'-desoxy-Derivate der fluoreszierenden Nukleotide sind kompetitive Inhibitoren der Guanylat- und Adenylat-Cyclasen (Gille et al., 2004; Gille und Seifert, 2003), da sie aufgrund der fehlenden OH-Gruppe an der 3'-Position nicht zum cyclischen Monophosphat umgesetzt werden können (Abbildung 8). Dies bestätigt sich auch durch das Fehlen eines innerhalb von 1 – 15 Minuten ansteigenden Maximums des 2'-Mant-3'-dGTPs bei 430 nm in den direkten Fluoreszenzmessungen, welches auf die Bildung von Mant-cGMP hinweisen würde (Newton et al., 2010).

Die Mant-Gruppe bindet in der Adenylat-Cyclase keilförmig in eine hydrophobe Bindetasche zwischen C1- und C2-Untereinheit der katalytischen Domäne (Mou et al., 2005). Die hydrophobe Tasche der Adenylat-Cyclase ist in der NOsGC konserviert (Liu et al., 1997; Sunahara et al., 1998; Tesmer et al., 1997). Da auch die Substratbindestelle in beiden Enzymen konserviert ist, mit Ausnahme der für die Diskriminierung zwischen GTP und ATP notwendigen Aminosäuren, liegt es nahe, dass die Mant-Gruppe in der NOsGC an einer äquivalenten Position zu der in der Position der

Adenylat-Cyclase bindet (Allerston et al., 2013; Liu et al., 1997; Sunahara et al., 1998). Mant-GTP-Derivate stellen demnach eine hervorragende Möglichkeit dar mit Hilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers und der Eigenfluoreszenz die Eigenschaften und Konformationsänderungen der Substratbindetasche zu untersuchen (Einzelheiten zur den Methoden siehe 3.2.9.1 und 0).

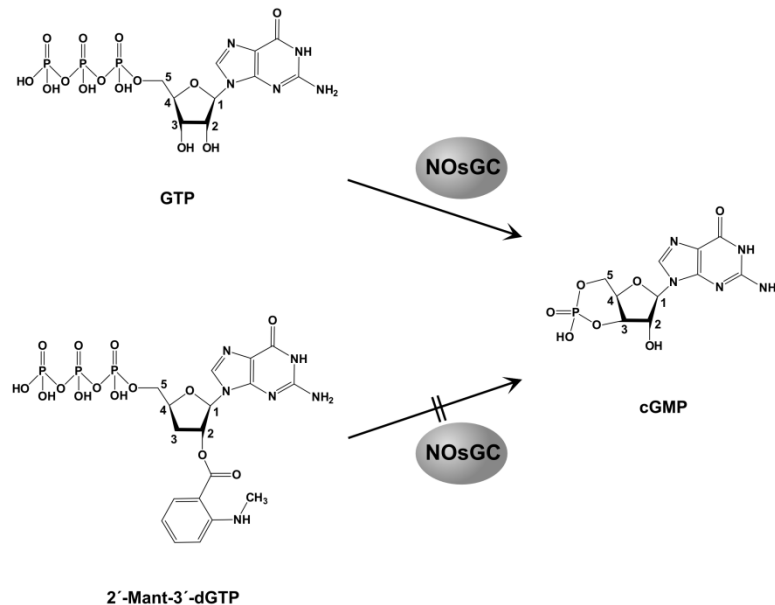


Abbildung 8: Umsetzung der Mant-Derivate durch die NOsGC

2'-Mant-3'-dGTP kann aufgrund der fehlenden OH-Gruppe an der 3'-Position nicht zum Mant-cGMP umgesetzt werden.

1.5. Fluoreszenzsensoren

Für das tiefere Verständnis der zahlreichen physiologischen Funktionen des cGMP ist es hilfreich Echtzeitmessungen der intrazellulären cGMP-Konzentration in lebenden Zellen durchführen zu können. Um die intrazelluläre Dynamik und die Mikropartimentierung des sekundären Botenstoffs cGMP mit Hilfe von mikroskopischen Techniken zu verfolgen, wurden daher Fluoreszenzsensoren entwickelt, die in verschiedene Zelllinien oder Organismen eingebracht werden können. Das Messprinzip dieser Sensoren beruht entweder auf Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen zwei Fluoreszenzproteinen oder auf der Detektion einer Einzelwellenlänge (Honda et al., 2001; Nausch et al., 2008; Niino et al., 2010; Nikolaev et al., 2006; Russwurm et al., 2007; Sato et al., 2000) (Abbildung 9). Die Fluoreszenzsensoren nutzen dabei entweder die PKG I oder die PDE als cGMP-bindendes Element und je nach Aufbau Fluoreszenzproteine wie das cyan fluoreszierende Protein (CFP), das gelb fluoreszierende Protein (YFP) oder das grün fluoreszierende Protein (GFP) für die Detektion (Erläuterungen zu FRET siehe 3.2.8).

Sensor	Aufbau	EC ₅₀ (μM)	Selektivität cGMP / cAMP	Signaländerung unter cGMP
CGY-Del1	48 671 CFP PKG Iα YFP	0,02	7,5	↑
Cygnat 2.1	79 671 CFP PKG Iα (T516A) YFP	1,7	>600	↓
cGi-500	79 345 CFP PKG Iα YFP	0,47	>2000	↓
cGES-DE2	392 525 YFP PDE2 CFP	0,9	128	↑
cGES-DE5	154 308 YFP PDE5 CFP	1,5	420	↑
Cygnus	154 308 sREACH PDE5 mTagBFP	1,0	400	↓
α-FlihcG	1 356 PKG Iα cpGFP	0,035	1140	↑
β-FlihcG	1 372 PKG Iβ cpGFP	1,1	30	↑
δ-FlihcG	77 356 PKG Iα cpGFP	0,17	280	↑

Abbildung 9: Fluoreszenzsensoren für cGMP

Erweitert nach Nikolaev et al., 2006.

Der erste Ansatz zur Echtzeitmessungen der intrazellulären cGMP-Konzentration wurde von Sato et al. entwickelt (Sato et al., 2000). Die Autoren nutzten die PKG Iα als Ausgangspunkt für einen FRET-basierten monomolekularen cGMP-Sensor. Sie fusionierten den FRET-Donor CFP amino-terminal und den FRET-Akzeptor YFP carboxy-terminal an die PKG Iα und nannten den Sensor CGY-Del1. CGY-Del1 nutzt die durch cGMP ausgelöste Konformationsänderung der regulatorischen Domäne der PKG Iα und zeigt in Anwesenheit von cGMP einen Anstieg des intramolekularen FRET zwischen den Fluoreszenzproteinen CFP und YFP. Um eine Dimerisierung der PKG Iα zu verhindern, fehlen dem Sensor die 47 amino-terminalen Aminosäuren der PKG Iα, wobei die autoinhibitorische Domäne erhalten bleibt. Ein Nachteil dieses Sensors ist die geringe Selektivität für cGMP gegenüber cAMP (Nikolaev et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Dostmann entwickelte parallel einen FRET-basierten cGMP-Sensor beruhend auf der PKG Iα, bei dem der Amino-Terminus der PKG Iα zusätzlich um die autoinhibitorische Domäne verkürzt ist (Honda et al., 2001). Des Weiteren führten die Autoren eine Punktmutation in der katalytischen Domäne der PKG Iα ein (T516A), um diese zu inaktivieren und das Auslösen nachgeschalteter Signalwege zu verhindern. Der entstandene cGMP-Sensor Cygnat 2.1 weist eine hohe Selektivität für cGMP auf und wurde in verschiedenen Studien zur Untersuchung des intrazellulären cGMP-Spiegels angewendet (Cawley et al., 2007; Hepp et al., 2007; Ma und Wang, 2007). Um die Sensitivität, die Geschwindigkeit der Messung und den dynamischen Messbereich zu

verbessern, führten Russwurm et al. 2007 systematisch Untersuchungen mit carboxy-terminal verkürzten Cygnet-artigen Sensoren durch. Der sensitivste dieser Sensoren, cGi-500, zeigt eine schnelle Bindungskinetik und eine hohe Spezifität für cGMP in vitro (Russwurm et al., 2007). In einer kürzlich erschienen Studie entwickelten Thunemann et al. transgene Mäuse, die den Sensor cGi-500 entweder ubiquitär oder spezifisch in glatten Muskelzellen exprimieren, um kardiovaskuläre cGMP-Signale in vitro und in vivo zu untersuchen (Thunemann et al., 2013).

Nikolaev und Lohse entwickelten cGMP-Sensoren, die auf der cGMP-bindenden Domäne der PDE2 und PDE5 beruhen. Die Amino- und Carboxy-Termini der Domänen wurden mit CFP und YFP fusioniert, sodass ebenfalls FRET-basierte Sensoren entstanden (cGES-DE2 und cGES-DE5) (Nikolaev et al., 2006). cGMP bindet an die allosterische, cGMP-bindende Domäne und löst eine Konformationsänderung aus, die im vollständigen Enzym die PDE-Aktivität der katalytischen Domäne stimulieren würde und im Sensor durch FRET zwischen CFP und YFP detektiert werden kann. Der Sensor cGES-DE5 weist eine hohe cGMP-Selektivität, eine schnelle Ansprechrate und eine ausgeprägte Änderung des FRET-Signals nach cGMP-Stimulation auf. Vergleichsmessungen mit Cygnet 2.1 und CGY-Del1 ergaben, dass cGES-DE5 eine höhere Selektivität für cGMP aufweist als CGY-Del1 und schneller auf einen NO-Stimulus reagiert als Cygnet 2.1 (Nikolaev et al., 2006).

Basierend auf dem cGES-DE5-Sensor entwickelten Niino et al. einen einfarbigen, auf Fluoreszenzlöschung basierenden cGMP-Sensor (Niino et al., 2010). Dieser besteht aus der cGMP-bindenden Domäne der PDE5, einem blau fluoreszierenden Protein (mTagBFP) und einem nicht fluoreszenten FRET-Akzeptor (sREACH). Die durch cGMP ausgelöste Konformationsänderung führt bei diesem Sensor zu einer verstärkten Fluoreszenzlöschung der mTagBFP-Fluoreszenz durch sREACH und damit zu einem detektierbaren Abfall der mTagBFP-Fluoreszenz. Der Vorteil dieses Einzelwellenlängen-Sensors ist, dass er mit Sensoren für weitere sekundäre Botenstoffe kombiniert werden kann. Es bietet sich so die Möglichkeit parallel in einer Zelle mehrere sekundäre Botenstoffe zu untersuchen und Informationen über ihre dynamischen Beziehungen zueinander zu gewinnen.

Ein neuer Ansatz zur Echtzeitmessungen der intrazellulären cGMP-Konzentration ist der nicht FRET-basierte Fluoreszenzsensor FlincG. Dieser wurde von Nausch et al. entwickelt und besteht aus dem regulatorischen Fragment der PKG I, welches mit einem cpEGFP („circular permuted enhanced green fluorescent protein“) fusioniert ist (Nausch et al., 2008). cpEGFP ist ein zirkulär umgekehrtes EGFP, bei dem der ursprüngliche Carboxy-Terminus (AS 145-238) über eine Verbindungssequenz (GGTGGG) mit dem ursprünglichen Amino-Terminus (AS 1-144) fusioniert wurde und ein neuer Amino- und Carboxy-Terminus zwischen den Aminosäuren 144 und 145 erzeugt wurde (Baird et al., 1999). Aufgrund dieser Umkehrung ist cpEGFP sensibel gegenüber Zug- und Spannungsänderungen auf seine neu erzeugten Termini und reagiert daher auf Konformationsänderungen eines fusionierten Proteins mit einem Anstieg oder Abfall seiner Fluoreszenzintensität (Baird et al., 1999; Nakai et al.,

2001; Nausch et al., 2008; Tallini et al., 2006). Diese Sensitivität wurde früher bereits für die Entwicklung von “GCaMP“ Ca^{2+} Indikatoren genutzt, bei denen die Ca^{2+} -abhängige Interaktion zwischen Calmodulin und dem spezifisch bindenden Protein M13 zu einer Konformationsänderung und zu einem Anstieg der Fluoreszenz des cpEGFP führt (Nagai et al., 2001; Nakai et al., 2001; Tallini et al., 2006).

Neben der intrazellulären Detektion des cGMP, gibt es auch Ansätze zur Echtzeitmessung der intrazellulären NO-Konzentration mit mikroskopischen Methoden. Diese Sensoren nutzen die Sensitivität und Selektivität der HNOX-Domäne der NOsGC für NO. Namiki et al. entwickelten einen Sensor für NO, der aus der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit der NOsGC und einem carboxy-terminal fusionierten GFP besteht (HBR-GFP) (Namiki et al., 2005). Durch die Bindung von NO kommt es zu einem Anstieg der GFP-Fluoreszenz, die auf einer intramolekularen Wechselwirkung und einer erhöhten Quantenausbeute des GFP beruht (Namiki et al., 2005). Der Nachteil dieses Sensors ist die sehr langsame Diffusionsrate des NO vom HBR-GFP, die eine dynamische Detektion des NO erschwert. Die heterodimere, vollständige NOsGC hingegen weist eine sehr hohe Diffusionsrate des NO vom Eisenzentralatom auf, sodass Namiki et al. eine Beteiligung der weiteren Domänen der NOsGC am Diffusionsprozess vermuteten (Kharitonov et al., 1997; Namiki et al., 2005). Die Verwendung der vollständigen NOsGC als NO-Sensor wäre demnach von Vorteil.

Einen entsprechenden Ansatz wählten Sato et al. Die Autoren fusionierten die beiden Untereinheiten der NOsGC, α_1 und β_1 , jeweils mit dem cGMP-Sensor CGY-Del1 (Sato et al., 2005). Werden diese beiden Untereinheiten gleichzeitig in Zellen exprimiert, dimerisieren sie zu einem aktiven Sensor-Heterodimer, genannt NOA-1. Dieses Heterodimer aus α_1 -CGY-Del1 und β_1 -CGY-Del1 bindet NO, produziert cGMP und emittiert ein FRET-Signal, wenn vier der gebildeten cGMP-Moleküle an die CGY-Domänen binden. Nach den Autoren soll weiteres gebildetes cGMP diffundieren und an NO-freie Sensor-Heterodimere und -Monomere binden. Dies soll zu einer Amplifikation des NO-Signals führen und für die hohe Sensitivität des Sensors verantwortlich sein (Nachweisgrenze: 0,1 nM) (Sato et al., 2005). Nachteil dieses NO-Sensors ist, dass zunächst eine Dimerisierung der beiden Untereinheiten stattfinden muss, damit ein cGMP-produzierendes Heterodimer entsteht.

2 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Verständnis des Aktivierungsmechanismus und der Signaltransduktion der NOsGC zu erweitern und Informationen über die Regulation ihrer intrazellulären Lokalisation zu gewinnen. Darüber hinaus sollen Fluoreszenzsensoren für die Messung der intrazellulären Aktivität der NOsGC charakterisiert und weiterentwickelt werden.

2.1. Konformationsänderungen der NOsGC

Die Informationen über Konformationsänderungen der NOsGC während der Aktivierung sind sehr begrenzt. Bisher ist unklar wie das Aktivierungssignal von der hämbindenden Domäne am Amino-Terminus auf die katalytische Domäne am Carboxy-Terminus übertragen wird. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist die Erweiterung des Verständnisses des Aktivierungsmechanismus und der Signaltransduktion während der Aktivierung der NOsGC mit Hilfe von fluoreszierenden Nukleotiden.

2.2. Lokalisation der NOsGC

Die membranäre Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform der NOsGC wurde von Bellingham 2007 beschrieben und von Haase 2010 auf eine Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten eingegrenzt. Dem zweiten Teil der Arbeit liegt das Bestreben zugrunde, die von Haase beschriebene Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten hinsichtlich ihrer Funktion zu untersuchen und mögliche Interaktionspartner zu ermitteln, die für diese Lokalisation verantwortlich sind.

2.3. NOsGC als Fluoreszenzsensor

Die Motivation für den dritten Teil der Arbeit beruht darauf, die intrazelluläre und lokalisationsbezogene Aktivität der NOsGC erfassbar zu machen. Die Aufgabe besteht zunächst darin, einen Fluoreszenzsensor auf Grundlage des cGMP-Fluoreszenzindikators FlincG (fluorescent indicator of cGMP) und den beiden Isoformen der NOsGC zu entwickeln und ein System zu etablieren mit dem die Detektion durchgeführt werden kann.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Hilfsmittel und Geräte

Allgemein

Analysenwaage BP 210 D	Sartorius AG (Göttingen)
Gefrierschrank -80°C Ultra low VIP™ Series	Sanyo, Panasonic Biomedical Sales Europe B.V. (Etten Leur, Niederlande)
Gefrierschränke -20°C und Kühlschränke 4°C	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH (Ochsenhausen)
Gefriertruhe -152°C Ultra low	Sanyo, Panasonic Biomedical Sales Europe B.V. (Etten Leur, Niederlande)
Glasflaschen SCHOTT Duran® 50 ml – 2 L	SCHOTT AG (Mainz)
Kreisschüttler Vortexer MS3 basic	IKA®-WERKE GMBH & CO. KG (STAUFEN)
Labor-pH-Meter 766 Calimatic®	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin)
Magnetrührer KMO2 basic	IKA®-WERKE GMBH & CO. KG (STAUFEN)
Messpipetten aus Glas 2 ml, 5 ml, 10 ml 25 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Pipetten P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson (Middelton, USA)
Pipetten Serien Research und Reference	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipettierhilfe HandyStep® Electronic	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pipettierhilfen pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Präzisionswaage PT 210	Sartorius AG (Göttingen)
Reinstwassersystem Ultra Clear	SG / Siemens Water Technologies (Barsbüttel)
Spritzen 20 ml, 60 ml	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sunrise™ Absorbance Reader	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin)
UV-Spektrophotometer NanoPhotometer®	Implen GmbH (München)
Wasserbad Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus / Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Aktivitätsmessungen

Chromatographie Säulen Poly-Prep	Bio-Rad Laboratories (München)
Scintillationsgefäße 20 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Szintillationszähler Coulter Counter LS6500	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)

Mikroskop-Messugen

Deckgläser (22 mm x 40 mm)	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig)
Fluorescence Lifetime Module (LIMO) für FLIM-Messungen, EZ-C1 Software	Nikon instruments Europe BV (Amsterdam, Niederlande)
Gasmischer 3GF-Mixer	Okolab (Ottaviano, Italien)
Imaging Plate CG, 24 Loch, Glasboden	PAA / GE Healthcare (Piscataway, USA)
Inkubationskammer	Okolab (Ottaviano, Italien)
Konfokales Laser-scanning Mikroskop-System	Nikon Instruments Europe BV (Amsterdam,

A1 mit FLIM und CLEM	Niederlande)
Schläuche, Polyethylen, unterschiedliche Durchmesser	Warner Instruments Corporation (Hamdan, USA)
Silikoneinsätze flexiPERM® 3,1 cm ²	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Spritzen 50 ml BD Plastipak™ LuerLok™	Becton, Dickinson and company (BD) (Franklin Lakes, USA)
Spritzen-Pumpe PHD ultra	Warner Instruments Corporation / Harvard Apparatus (Holliston, USA)
Tempertur-Regeleinheit	Okolab (Ottaviano, Italien)
Perifusionskammer, Confocal imaging chamber RC-30 mit Zubehör	Warner Instruments Corporation (Hamdan, USA)
Ventil-System VC-6 six channel valve controller	Warner Instruments Corporation (Hamdan, USA)

Molekularbiologische Arbeiten

Agarosegelkammern SciePlas H3-SET	Herolab (Wiesloch)
Agarosegelkammer SUB-Cell® GT	Bio-Rad Laboratories (München)
Brutschrank Kelvitron®t	Heraeus / Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Digitalwaage PT310	Sartorius AG (Göttingen)
Geldokumentationssystem Gel IX Imager	Intas (Göttingen)
PCR-Gerät Primus 96 advanced®	Peq Lab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Schüttelinkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific / Eppendorf (Enfield, USA)
Stromversorgungsgerät PowerPac300	Bio-Rad Laboratories (München)

Proteinreinigung

ÄKTApurifier 100	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Tricorn 5 Filter kit	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Tricorn™ 10/20 Leersäulen	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)

SDS-PAGE und Western Blot

ECL Dokumentationsanlage ChemiLux	Intas (Göttingen)
Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories (München)
Filterpapiere 3 mm	Bio-Rad Laboratories (München)
Nitrocellulosemembran Amersham™	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Hybond™-ECL	
Schwenktisch Biometra WT12®	Biometra GmbH (Göttingen)
Semi-Dry Elektrobloetter Sedec™ M	Peq Lab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Stromversorgungsgerät EV231	Peq Lab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Stromversorgungsgerät PowerPac300	Bio-Rad Laboratories (München)

Spektroskopische Messungen

Fluoreszenzphotometer Cary Eclipse	Varian / Agilent Technologies (Waldbronn)
Küvetten-Heizsystem FLR Singel Cell Peltier	Varian / Agilent Technologies (Waldbronn)
Präzisionsküvette Quarzglas 105.201-QS	Hellma (Mühlheim)
Schichtdicke 10 mm, Volumen 100 µl	
UV-visible Spektrophotometer Cary 50	Varian / Agilent Technologies (Waldbronn)

Zellkultur

Absaugsystem VACUSAFE comfort	INTEGRA Biosciences GmbH (Fernwald)
Brutschrank Stabilitherm	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
CO ₂ -Inkubator InCusafe MCO18AC	Sanyo, Panasonic Biomedical Sales Europe B.V. (Etten Leur, Niederlande)

Lichtmikroskop IDO3	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena)
Reinraumwerkbank HERAsafe	Heraeus / Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Schüttelinkubator Excella E24	New Brunswick Scientific / Eppendorf (Enfield, USA)
Schüttelinkubator Innova® 44	New Brunswick Scientific / Eppendorf (Enfield, USA)
Spritzensterilfilter Filtropur S 0,45 µM, 0,22 µM	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Sterilfilter Steritop™ 0,22 µM	Millipore Corporation (Billerica, USA)
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Einwegmaterialien wie Zellkulturflächen (25 cm², 75 cm²), Zellkulturplatten (6-Loch, 24-Loch, 96-Loch), Spitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl), Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml 25 ml) und Reaktionsgefäße (200 µl, 1,5 ml, 2 ml, 10 ml, 50 ml) wurden von Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) bezogen.

3.1.2. Chemikalien und Substanzen

[α- ³² P]-GTP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure (HABA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
2'-Mant-3'-dGTP	Jena Bioscience GmbH (Jena)
3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
8-Br-cGMP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Agar Kobe I	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Agarose low EEO	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von	der Firma New England Biolabs GmbH bezogen.
Aluminiumoxid, EcoChrome™ Alumina N	MP Biomedicals Europe (Illkirch, Frankreich)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Avidin	IBA GmbH (Göttingen)
BAY 41-2272	Johannes-Peter Stasch, Bayer Schering Pharma AG (Wuppertal)
BAY 41-8543	Johannes-Peter Stasch, Bayer Schering Pharma AG (Wuppertal)
Benzamidin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Bluo-gal	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Calciumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
cGMP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Cinaciguat (BAY 58-2667)	Johannes-Peter Stasch, Bayer Schering Pharma AG (Wuppertal)
Complete Protease-Inhibitor-Cocktail Tabletten (PIC)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Coomassie® Brilliant Blau G 250	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
D-Desthiobiotin	IBA GmbH (Göttingen)
DEA/NO (Diethylamine NONOate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
DETA/NO (Diethylenetriamine/nitric)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Dimethylformamid (DMF)	
di-Natiumhydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
Dithiotreitol (DTT)	AppliChem GmbH (Darmstadt)

DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
DNA-Größenstandard GeneRule™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas / Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Eisessig	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol (99%)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethanol 100 % vergällt mit 1 % Petrolether	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG (Ludwigshafen)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Fetales Rinderserum (FBS)	PAA / GE Healthcare (Piscataway, USA)
Gentamycin 50 mg/ml	Life Technologies GmbH, Gibco (Darmstadt)
Glyzerin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
GTP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Isopropanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kanamycin 50 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Kreatinphosphokinase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Manganchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Milchpulver	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumacetat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
ortho-Phosphorsäure 99 %	Fluka / Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Penicillin /Streptomycin 100x	PAA / GE Healthcare (Piscataway, USA)
Perchlorsäure 70 %	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Pferdeserum, Donor Horse serum	PAA / GE Healthcare (Piscataway, USA)
Polyethylenimin, linear, 25 kDa (PEI)	Polyscience, Inc. (Warrington, USA)
Ponceau S	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Salzsäure 37 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas / Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Strep-Tactin® Superflow® high capacity	IBA GmbH (Göttingen)
T4 DNA Ligase	Fermentas / Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TEMED	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Triethanolamin-Hydrochlorid (TEA/HCL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Tris-Base	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Trypsin-EDTA 1x	PAA / GE Healthcare (Piscataway, USA)
Trypton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Xylenglycol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Zaprinast	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Zinkacetat	Merck KGaA (Darmstadt)

3.1.3. Reagenziensysteme

Bac-to-Bac [®] Baculovirus Expression System	Life Technologies GmbH, Invitrogen [™] (Darmstadt)
Cellfectin [®] II Reagent	Life Technologies GmbH, Invitrogen [™] (Darmstadt)
Lipofectamine [®] LTX & Plus [™] Reagent	Life Technologies GmbH, Invitrogen [™] (Darmstadt)
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim)
PureLink [®] HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Life Technologies GmbH, Invitrogen [™] (Darmstadt)
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)

3.1.4. Puffer und Lösungen

Aktivitätsmessungen

Mastermix-Lösung	50 mM TEA-Puffer, 1 mM IBMX, 3 mM MgCl ₂ , 3 mM DTT, 5 mM Kreatinphosphat, 1 mM cGMP, 500 nM GTP, 0,025 % Kreatinphosphokinase, pH 7,4
Natriumacetat-Lösung	250 mM, pH 6,5
Natriumcarbonat-Lösung	120 mM
Perchlorsäure-Lösung	1,1 M
Zinkacetat-Lösung	120 mM

Molekularbiologische Arbeiten

Ampicillin	100 mg / ml
Ampicillin-Agarplatten	0,1 mg / ml Ampicillin, LB-Agar
DNA-Ladepuffer (6 x)	10 mM Tris; 60 mM EDTA; 60 % Glycerin; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol; pH 7,6
Kanamycin-Agarplatten	0,05mg / ml Kanamycin, LB-Agar
Lösung I	50 mM Glucose; 25 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0
Lösung II	0,2 M NaOH; 1 % SDS (w/v)
Lösung III	3 M Kaliumacetat; 12 % Essigsäure (v/v)
NaOH	10 mM
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 0,1 mM EDTA; pH 7,6
TRAPO-Agarplatten	LB-Agar, 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml Bluo-Gal, 40 µg/ml IPTG

Proteinreinigung

Elutionspuffer	100 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 10 mM DTT, 2,5 mM D-Desthiobiotin; pH 8,0
Regenerationspuffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA; pH 8,0
TEA-Lysis-Puffer	50 mM TEA; 1 mM EDTA; 10 mM DTT; pH 7,4; PIC (1 Tablette auf 50 ml kurz vor der Verwendung des Puffers hinzugegeben)
Waschpuffer	100 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 10 mM DTT; pH 8,0

SDS-PAGE und Western Blot

10 % Trenngel (Menge für 2 Gele)	6 ml Reinstwasser, 3,75 ml 4 x Trenngelpuffer, 5 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung, 15 µl TEMED, 150 µl 10 % Ammoniumpersulfat
----------------------------------	---

2 x SDS-Probenpuffer	1 % SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, 30 % Glycerol, pH 7,5
5% Sammelgel (Menge für 2 Gele)	2,9 ml Reinstwasser, 5 ml 2 x Sammelgelpuffer, 2 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung, 6 µl TEMED, 120 µl 10 % Ammoniumpersulfat
Acryl/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
Ammoniumpersulfatlösung	10 % APS
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver (w/v) in TBST
Bradford Reagenz	Roti® Quant (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Bromphenolblau-Lösung	2 x SDS-Probenpuffer, 0,018% (w/v) Bromphenolblau
Coomassie Färbelösung	0,02 % Brilliantblau G 250 (w/v); 5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat (w/v); 10 % Ethanol (96 %) (v/v); 2 % ortho-Phosphorsäure (w/v)
Entfärbelösung für Coomassie	10 % Ethanol (96 %) (v/v); 2 % ortho-Phosphorsäure (w/v)
PBS	1,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 150 mM Natriumchlorid; 5,2 mM di-Natriumhydrogenphosphat; pH 7,4
Ponceau S Färbelösung	0,5 % Ponceau S (w/v); 1 % Eisessig (v/v)
Proteinstandard, gefärbt	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA))
Proteinstandard, ungefärbt	PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA))
Sammelgel-Puffer (2x)	0,25 M Tris; 0,2 % SDS (w/v); pH 6,8
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (w/v); pH 8,3-8,8
TBST (10 x)	1,5 M NaCl; 100 mM Tris; 1% Tween 20 (v/v)
Transfer-Puffer (10 x)	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 0,2 % SDS (w/v); pH 8,3
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris; 0,4 % SDS (w/v); pH 8,8

Spektroskopische Messungen

HEPES-Puffer mit Mg^{2+}	25 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, pH 7,4
TEA-Lysispuffer mit Mn^{2+}	TEA-Lysispuffer, 5 mM $MnCl_2$

Zellkultur

PBS (steril)	1,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 150 mM Natriumchlorid; 5,2 mM di-Natriumhydrogenphosphat; pH 7,4
PEI-Transfektionsreagenz	PEI 1 mg/ml, pH 7,4, sterilfiltriert

Stammlösungen Wirkstoffe

2'-Mant-3'-dGTP	150 µM in Wasser
8-Br-cGMP	10 mM in DMEM high glucose
BAY 41-2272	1 mM in 100 % DMSO
BAY 41-8543	1 mM in 100 % DMSO
Cinaciguat	10 mM in 100 % DMSO
DEA/NO	10 mM in 10 mM NaOH (Aktivitätsassay) oder in der jeweiligen Pufferlösung (Fluoreszenz-messungen)
DETA/NO	10 mM in DMEM high glucose
Zaprinast	10 mM in 100 % DMSO

3.1.5. Zellen

Bakterienstämme

Max Efficiency® DH10 BAC™	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt)
Competent Cells	
One Shot® TOP 10 competent cells	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt)
XL10-Gold ultracompetent cells	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)

Eukaryotische Zelllinien

HEK293	Leibnitz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
PC12	Leibnitz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
Sf9	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt)

3.1.6. Zellkulturmedien

DMEM (4.5g/l Glukose) ohne Phenolrot mit L-Glutamin	PAA / GE Healthcare (Piscataway, USA) Es wurden 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt.
LB-Agar	LB-Medium + 1,5 % Agar (w/v)
LB-Medium	1 % Trypton (w/v); 0,5 % Hefeextrakt (w/v); 1 % NaCl (w/v); pH 7,0
RPMI 1640 ohne Phenolrot mit L-Glutamin	PAA / GE Healthcare (Piscataway, USA) Es wurden 10 % FBS, 5 % Pferdeserum und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt.
Sf-900™ II SFM	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt) Es wurden 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt.
SOC-Medium	2 % Tryptone (w/v); 0,5 % Hefeextrakt (w/v); 10 mM NaCl; 10 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose

3.1.7. Antikörper

anti-GFP Antikörper Living Colors®, Kaninchen (1:2000)	Clontech Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA)
anti-goat IgG-Peroxidase I (1:1000)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
anti-Guanylat-Cyclase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
α ₁ Antikörper, Kaninchen (1:5000)	Die Herstellung der Antikörper erfolgte wie bei Bamberger et al. 2001. Als Epitope wurden die Peptide LGSDYLETSPEEEGEC und KP PPKPSLSSSRIKKC verwendet. Eurogentec, EP073512 und EP073513
anti-Guanylat-Cyclase α ₂ Antikörper Kaninchen (1:750)	
anti-Guanylat-Cyclase β ₁ Antikörper (SN15), Kaninchen (1:4000)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
anti-Kaninchen IgG HRP-linked Antikörper („horse radish peroxidase“) (1:2000)	Cell Signaling Technology, Inc. (Denvers, USA)
anti-Scrib Antikörper (K-21), Kaninchen (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)

3.1.8. Vektoren und DNA

Vektoren

pFastbac-1	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt)
pECFP-C1	Clontech Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA)
pECFP-N1	Clontech Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA)
pEYFP-C1	Clontech Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA)
pEYFP-N1	Clontech Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA)
pcDNA™3.1/V5/His TOPO®	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt)
pcDNA™3.1 (-)	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt)

*DNA-Konstrukte**Konformationsänderungen der NOsGC*

<i>DNA</i>	<i>Vektoren</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Virus-Nr.</i>
α_1 S (Ratte)	pFastbac-1	Haase et al., 2010a	48
α_1 S W352F (Ratte)	pFastbac-1	Mutagenese von α_1 S (Ratte) in pFB	149
α_1 S W466F (Ratte)	pFastbac-1	Mutagenese von α_1 S (Ratte) in pFB	148
α_1 S W669A (Ratte)	pFastbac-1	Mutagenese von α_1 S (Ratte) in pFB	24
α_1 S W352F W669A (Ratte)	pFastbac-1	Mutagenese von α_1 S W669A (Ratte) in pFB	150
β_1 (human)	pFastbac-1	Koglin und Behrends, 2000	C
β_1 W22F (human)	pFastbac-1	Mutagenese von β_1 (human) in pFB	146
β_1 W22A (human)	pFastbac-1	Mutagenese von β_1 (human) in pFB	76
β_1 W602F (human)	pFastbac-1	Mutagenese von β_1 (human) in pFB	153
β_1 H105A (human)	pFastbac-1	Mutagenese von β_1 (human) in pFB	85
β_1 W22F W602F (human)	pFastbac-1	Mutagenese von β_1 W22F (human) in pFB	154

Lokalisation der NOsGC

<i>DNA</i>	<i>Vektoren</i>	<i>Herkunft</i>
Scrib-CFP	pECFP-N1	Haase, 2010
YFP α_2	pEYFP-C1	Haase, 2010
YFP α_2 601-730	pEYFP-C1	Klonierung (siehe 3.2.1.4)
YFP α_2 680-730	pEYFP-C1	Klonierung (siehe 3.2.1.4)
YFP α_2 QLRETSL	pEYFP-C1	Mutagenese von YFP α_2 in pEYFP-C1
YFP α_2 RETAL	pEYFP-C1	Mutagenese von YFP α_2 in pEYFP-C1
YFP α_2 RETEL	pEYFP-C1	Mutagenese von YFP α_2 in pEYFP-C1
YFP α_2 S717E	pEYFP-C1	Mutagenese von YFP α_2 in pEYFP-C1
YFP α_2 S7E	pEYFP-C1	Mutagenese von YFP α_2 in pEYFP-C1
YFP α_2 RETSR	pEYFP-C1	Mutagenese von YFP α_2 in pEYFP-C1
β_1 -CFP	pECFP-N1	Haase et al., 2010a
β_1 YFP α_2	pEYFP-C1	Haase, 2010
β_1 YFP α_2 RETSR	pEYFP-C1	Haase, 2010

NOsGG-Aktivitätssensoren

<i>DNA</i>	<i>Vektoren</i>	<i>Herkunft</i>
FlinG	pcDNA3.1 (-)	Addgene (Cambridge, USA)
β_1 (human)	pcDNA3.1/V5/His-Topo	Koglin und Behrends, 2000
α_1 (Ratte)	pcDNA3.1/V5/His-Topo	Haase et al., 2010a
β_1 FlinG α_2	pEYFP-C1	Klonierung
$\beta_1\alpha_1$ FlinG	pcDNA3.1 (-)	Klonierung
α_2 (Ratte)	pcDNA3.1/V5/His-Topo	Koglin and Behrends et al 2000

3.1.9. Oligonukleotide für Mutagenesen

<i>Mutation</i>		<i>Nr.</i>	<i>Sequenz</i>
α_1 S W352F	sense	437	5'-gtttgtcatacgggtgaggagatttgataacttagtgaagaaatcttc-3'
	anti	438	5'-gaagatttcttactaagtatcaaatctcctcaccgtagacaaac-3'
α_1 S W466F	sense	429	5'-ctgagggtgctcagcagctctccaaggacaaattgtgcaagcc-3'
	anti	430	5'-ggcttgacacaattgtccttggaagagctgctgagcaacctcag-3'
α_1 S W669A	sense	359	5'-aaggacctaattctaaccagcgtccagcagaaagatgcag-3'
	anti	360	5'-ctgcatctttctgctggaacgctggttagaattaggtcctt-3'
β_1 W22F	sense	425	5'-aattacggccccgaggtgttgaagacatcaaaaaagaggc-3'
	anti	426	5'-gcctctttttgatgtcttcaaacacctcggggccgtaatt-3'
β_1 W22A	sense	373	5'-aattacggccccgaggtggcgaagacatcaaaaaagag-3'
	anti	374	5'-ctcttttttgatgtcttccgccacctcggggccgtaatt-3'
β_1 W602F	sense	441	5'-tccatgaaggggcaaaaaagaaccaatgcaagttttttctatccagaaaaata-3'
	anti	442	5'-tattttttctggatagaaaaaaactgcattggttctttttgccttcatgga-3'
β_1 H105A	sense	329	5'-gaaccttgatgctctggccgaccaccttgctacc-3'
	anti	330	5'-ggtagcaagggtgctcggccagagcatcaagggtc-3'
YFP α_2 RETSR	sense	361	5'-ctccgagaaactagccgctgagattgctgcag-3'
	anti	362	5'-ctgcagcaaatctcagcggctagtcttctcgag-3'
YFP α_2 S7E	sense	431	5'-agcatgtctcgcaggaagattgaatccgagtcctcagc-3'
	anti	432	5'-gctgaaggactcggattcaatcttctgcgagacatgct-3'
YFP α_2 S717E	sense	435	5'-catccctgtcttcacgcagaataaaaaaggtgaatacaatttggcacgatgttcc-3'
	anti	436	5'-ggaacatcgtgccaatattgtattcaacctttttattctcgatgaagacagggatg-3'
YFP α_2 RETAL	sense	445	5'-tggcacgatgttctcctcgagaaactgccctctgagattg-3'
	anti	446	5'-caaatctcagagggcagtttctcggaggaacatcgtcca-3'
YFP α_2 RETEL	sense	433	5'-acgatgttctcctcgagaaactgaactctgagattgctgcagatc-3'
	anti	434	5'-gatctgcagcaaatctcagagttcagtttctcggaggaacatcgt-3'
YFP α_2 QLRETSL	sense	447	5'-cctacaatattggcacgatgcagctccgagaaactagcctctg-3'
	anti	448	5'-cagaggctagtttctcggagctgcacgtgccaatattgtagg-3'
FlinG Stopkodon	sense	355	5'-gcacaagctggagtacaactccgattccaccactggactag-3'
	anti	356	5'-ctagtccagtggtggaatccggagttgtactccagcttgtgc-3'

Alle Oligonukleotide wurden im HPLC-Reinheitsgrad bei biomers.net GmbH (Ulm) bestellt. Die Nummern geben die institutsinterne Nummerierung wieder.

3.1.10. Verwendete Programme

ChemBioDraw Ultra 12.0	CambrideSoft, PerkinElmer (Waltham, USA)
ClustalW2	European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI, Cambridge) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)
EndNote X3	Thomson Reuters (Carlsbad, USA)
Inkscape	Inkscape (Freeware)
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
NIS-Elements Ar Microscope Imaging Software	Nikon Instruments Europe BV (Amsterdam, Niederlande)
SigmaPlot 10	Systat Software (San José, USA)

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation

Um mit Hilfe von *E. coli* Bakterien Plasmidvektoren vermehren zu können, müssen diese in der Lage sein Fremd-DNA aufzunehmen. Dieser transiente Zustand der „Kompetenz“ kann durch Behandlung mit Calciumchlorid erzeugt werden. Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien wurden zunächst 100 ml LB Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und diese bei 37 °C in einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte bei 595 nm von 0.6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden sie bei 4 °C und 4500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 25 ml einer eiskalten 100 mM Calciumchloridlösung resuspendiert und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm für 5 Minuten wurden die Bakterien in 10 ml eiskalter Calciumchlorid / Glycerin Lösung (100 mM / 20 %) noch einmal resuspendiert. Die chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien wurden anschließend zu je 250 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bei -80 °C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert. Vor der Verwendung wurden sie durch die Transformation mit dem pUC 18 Plasmid (New England Biolabs GmbH) oder Wasser als Negativkontrolle auf Kompetenz und mögliche Kontamination getestet.

Für die Transformation wurden 90 µl chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien mit 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl Mutagenese Ansatz vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt und danach sofort für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Durch dieses kurzzeitige Erhitzen wird die Bakterienzellwand durchlässig für hochmolekulare DNA Moleküle und die Plasmid-DNA kann von den Bakterien aufgenommen werden. Um die Bakterien zu vermehren, wurden sie mit 250 µl SOC Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C und 350 rpm im Heizblock inkubiert. 350 µl der Bakteriensuspension wurden auf antibiotikahaltigen LB Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA verleiht den Bakterien einen Selektionsvorteil aufgrund der auf dem Plasmid codierten Antibiotikaresistenz.

3.2.1.2. Plasmidisolation aus *E. coli*

Birnboim und Doly veröffentlicht 1979 eine einfache Methode, um Plasmid-DNA aus Bakterienzellen zu isolieren. Die Methode beruht auf dem Prinzip der selektiven alkalischen Denaturierung von hochmolekularer chromosomaler DNA, während kovalent geschlossene zirkuläre DNA weiterhin als Doppelstrang vorliegt. Nach Neutralisation renaturiert die chromosomale DNA, und bildet einen unlöslichen Niederschlag. Die Plasmid-DNA bleibt dabei in Lösung.

Aus 2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurde durch Zentrifugation mit 21.000 x g für 1 Minute ein Zellsediment gewonnen, das mit 100 µl neutraler Lösung I mit 1 mg / ml RNase und Lysozym resuspendiert wurde. Durch die RNase wird die RNA der Zellen abgebaut während Lysozym eine Schädigung der Zellmembran bewirkt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurde durch Zugabe von 200 µl der stark alkalischen Lösung II, die das ionische Detergenz SDS enthielt, die Lyse der Bakterien eingeleitet. Durch den stark alkalischen pH-Wert denaturiert die chromosomale DNA. Aufgrund des Supercoiling trennen sich die beiden DNA Stränge der Plasmide im Gegensatz zu den Strängen der chromosomalen DNA nicht. Es erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Die Zugabe von 150 µl der Kaliumacetat enthaltenden Lösung III führt zu einer Neutralisation des pH-Werts und damit zu einer Renaturierung und Aggregation der chromosomalen DNA. Gleichzeitig kommt es zu einer Ausfällung von Protein-SDS Komplexen und hochmolekularer RNA. Diese ließen sich nach einer Inkubation von 10 Minuten mit 21.000 x g für 15 min abzentrifugieren. Aus dem Überstand konnte die immer noch gelöste Plasmid-DNA durch eine Alkohol-Fällung isoliert werden. In Anwesenheit von 450 µl Isopropanol und 45 µl Natriumacetat (pH 4,8) ließ sie sich bei 21.000 x g für 30 Minuten abzentrifugieren. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 21.000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Isolation von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurde das HiPure Plasmid Maxiprep® Reagenziensystem der Firma Invitrogen verwendet. Aus 200 ml einer Übernachtskultur wurde die DNA über Affinitätssäulen nach Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt.

3.2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann DNA nach ihrem Polymerisationsgrad aufgetrennt werden. Die Auftrennung erfolgt dabei in einem elektrischen Feld, in dem die durch ihre Phosphatreste negativ geladene DNA zur Anode wandert. Je länger die Basensequenz, desto langsamer ist die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Laufweite.

Für die Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurden 4 g Agarose in 400 ml 1 x TAE-Puffer (Triacetat-EDTA-Puffer) suspendiert und in der Mikrowelle zum Kochen erhitzt. Diese Lösung wurde mit Ethidiumbromid (0,01 %) versetzt, in eine Gelgießvorrichtung mit Probentaschenkamm überführt und bis zum Erstarren abkühlen gelassen. Ethidiumbromid ist ein DNA-Interkalator, der sich zwischen die DNA-Basenpaare schiebt und die DNA im UV-Licht sichtbar macht. Das Gel wurde in eine waagerechte Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer bedeckt. Die zuvor gewonnene und in Wasser aufgenommene Plasmid-DNA wurde mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Probentaschen pipettiert. Zum Vergleich wurde jeweils in die erste und die letzte Probentasche ein DNA-Größenstandard (1 kb) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung

von 80 V durchgeführt, bis eine ausreichende Auftrennung der DNA erreicht wurde. Die Größe der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des DNA-Größenstandards, einer UV-Kammer und des Geldokumentationssystems Gel IX Imager bestimmt. Die für die weitere Klonierung benötigten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, für 20 Minuten eingefroren und anschließend durch manuelles Herausdrücken der DNA-Lösung aus dem Agarosegel isoliert.

3.2.1.4. Klonierung der verwendeten Plasmid-DNA

YFP α_2 680-730 und YFP α_2 601-730

Der Vektor pEYFP-C1 mit YFP α_2 (Haase, 2010) wurde zunächst mit BglII linearisiert und die überhängenden Enden mit der Klenow-Large-Fragment-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Anschließend wurde der lineare Vektor mit dem Restriktionsenzym XmnI verdaut und ein 4910 bp und ein 5147 bp großes Fragment isoliert, deren glatte Enden religiert wurden. Die fertigen Vektoren enthalten die Sequenz von EYFP verbunden mit der Sequenz für die 51 carboxy-terminalen Aminosäuren der α_2 -Untereinheit oder der Sequenz für die 130 carboxy-terminalen Aminosäuren der α_2 -Untereinheit. Die Klonierung wurde von Elena Puhmann durchgeführt.

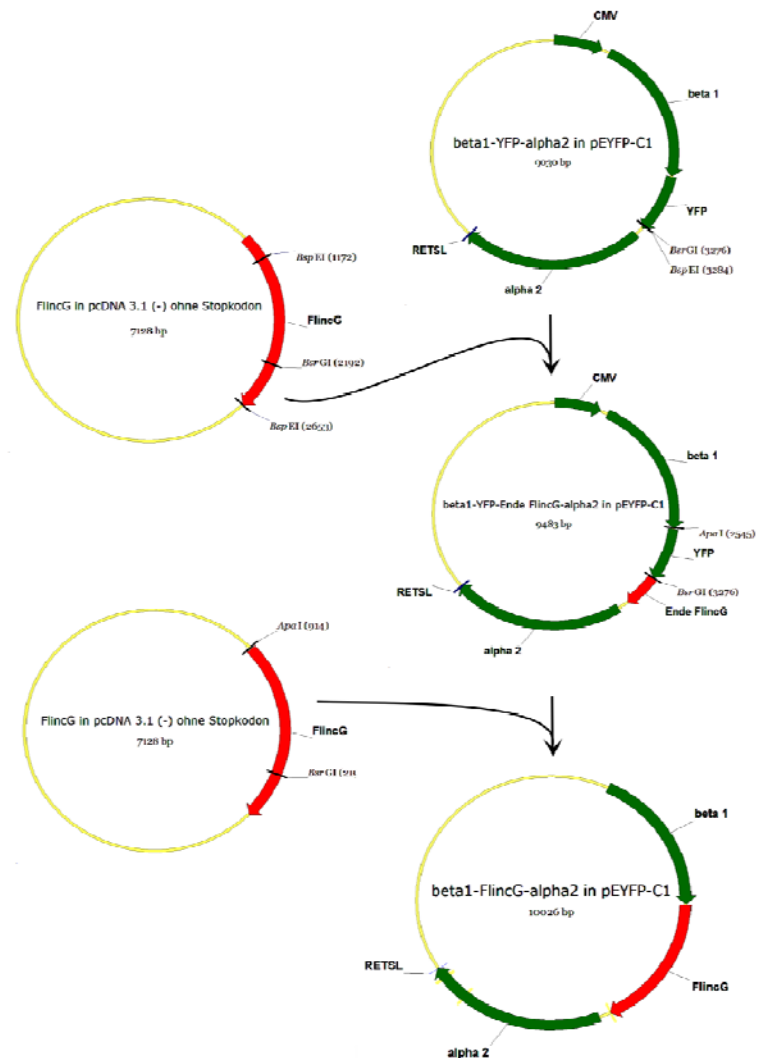
$\beta_1\alpha_1$ FlincG

Die DNA-Sequenz des Fusionskonstrukts $\beta_1\alpha_1$ (Haase et al., 2010a) wurde mit den Restriktionsenzymen NheI / XbaI aus dem Vektor pEYFP-N1 herausgeschnitten. Dabei wären zwei etwa gleich große DNA-Fragmente entstanden. Um die DNA-Fragmente unterscheiden zu können wurde zusätzlich mit NarI geschnitten, welches eine Schnittstelle im Vektor pEYFP-N1 erkennt. Die DNA des Fusionskonstrukts $\beta_1\alpha_1$ wurde in den NheI / XbaI aufgeschnittenen Vektor pcDNA 3.1 (-) kloniert, der außerdem die DNA-Sequenz des α -FlincG-Konstrukts enthielt. Die Klonierung wurde von Tobias Haase durchgeführt.

β_1 FlincG α_2

Zunächst wurde das Stoppcodon am Ende der DNA-Sequenz des FlincG im pcDNA 3.1(-)-Vektor (Addgene, Cambridge, USA) mit Hilfe des Reagenziensystems „Site-directed Mutagenesis Kit“ und den Oligonukleotiden Nr. 355 und Nr. 356 (siehe 3.1.9) durch eine PCR mutiert und durch diese Mutation gleichzeitig eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BspEI geschaffen. Dadurch wurden die Voraussetzungen für einen durchgängigen Leserahmen im fertigen Konstrukt geschaffen. Anschließend wurde durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen BsrGI / BspEI ein 461 bp-Fragment der DNA des FlincGs (entspricht dem Ende der FlincG-Sequenz) aus dem pcDNA 3.1-Vektor isoliert (Abbildung 10). Parallel dazu wurde der Vektor pEYFP-C1 mit der DNA des Fusionskonstrukts β_1 YFP α_2 (Haase, 2010) mit den Restriktionsenzymen BsrGI / BspEI zwischen der

EYFP-Sequenz und der α_2 -Sequenz aufgeschnitten. Das 461 bp lange Fragment des α -FlnG wurde in diesen vorbereiteten Vektor kloniert. Der daraus entstandene Vektor wurde mit *ApaI* / *BsrGI* geschnitten und die Sequenz für EYFP eliminiert, sodass dieser nur noch die DNA-Sequenz von β_1 -Ende-FlnG- α_2 enthielt. Gleichzeitig wurde der α -FlnG enthaltende pcDNA 3.1(-)-Vektor ebenfalls mit *ApaI* / *BsrGI* geschnitten und eine 1278 bp lange Sequenz, die für den Anfang des α -FlnG kodiert, isoliert. Dieses Fragment wurde in den Vektor kloniert, aus dem zuvor die DNA des EYFPs mit *ApaI* / *BsrGI* herausgeschnitten wurde. Um das Konstrukt in einen vollständigen Leserahmen zu bringen wurde erneut mit *ApaI* geschnitten und die Überhänge mit der Mung Bean Nuklease entfernt. Durch Religation der glatten Enden entstand die fertige Sequenz für das Fusionskonstrukt β_1 FlnG α_2 im Vektor pEYFP-C1. Die Klonierung wurde von Nadine Haase durchgeführt.



3.2.1.5. Mutagenesen

Die Mutagenesen wurden mit dem Reagenziensystem „QuikChange

Abbildung 10: Klonierung von β_1 FlnG α_2

FlnG wurde in zwei Teilen zwischen die beiden Untereinheiten der NOsGC eingebracht.

Lightning Site-Directed Mutagenese Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die veränderten Oligonukleotide wurden bei der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bestellt (siehe 3.1.9).

3.2.1.6. Überprüfung der Plasmid-DNA

DNA-Konzentrationen können durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt werden. Die Konzentrationen der DNA-Plasmide wurden daher mit einem NanoPhotometer[®] gemessen. Eine dsDNA-Lösung mit einer optischen Dichte von 1,0 hat bei einer Schichtdicke von 10 mm eine Konzentration von 50 µg / ml. Mit Hilfe dieser Konzentration und Korrekturfaktoren für die

Anpassung der Schichtdicke und der Verdünnung berechnet das Gerät die jeweilige DNA-Konzentration. Parallel dazu wird die Absorption bei 280 nm gemessen und das Verhältnis aus der Absorption bei 260 / 280 nm angegeben. Dieses Verhältnis gibt den Reinheitsgrad der DNA wieder, da Proteine im Gegensatz zu DNA stärker bei 280 nm absorbieren. In der Regel lag das Verhältnis zwischen 1,6 - 1,85.

Um die Sequenzen der klonierten und mutierten Vektoren zu prüfen, wurden die DNA-Plasmide an die Firma GATC Biotech AG (Köln) geschickt, die eine Sanger-Sequenzierung durchführte. Dafür wurde die DNA auf eine Konzentration von 30-100 ng / μ l mit Wasser verdünnt.

3.2.2. Proteinexpression in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney), die mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 transformiert wurden. Da sie adhärent und einschichtig wachsen und sich gut mit Fremd-DNA transfizieren lassen, eignen sie sich hervorragend für die Expression fluoreszierender rekombinanter Proteine und deren Untersuchung mit dem Laser-Scanning-Mikroskop.

3.2.2.1. Kultivierung von HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen wurden in DMEM high glucose mit 10 % FBS, 1 % Penicillin / Streptomycin ohne Phenolrot bei 37 °C kultiviert. Um die Zellen umzusetzen, wurde zunächst das verbrauchte Medium von den Zellen abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Dieses war notwendig, um das Ablösen des Zellrasens mit Trypsin zu ermöglichen, da das FBS im Medium die Aktivität des Trypsins blockiert. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und 2 ml einer 1 x Trypsin / EDTA-Lösung vorsichtig auf den Zellrasen gegeben und durch Schwenken verteilt. Die Zellen wurden für 3 - 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und zwischenzeitlich unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Sobald die Zellen begannen sich abzurunden und vom Flaschenboden zu lösen wurde die Zellsuspension mit einer Pipette aufgenommen und in 20 ml 37 °C warmes frisches DMEM-Medium high glucose mit 10 % FBS, 1 % Penicillin / Streptomycin ohne Phenolrot überführt. Das FBS des Mediums stoppt die Reaktion des Trypsins, welches außerdem im Medium ausreichend verdünnt wird. Die Zellsuspension wurde anschließend für 1 Minute bei 900 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um das gesamte Trypsin aus der Lösung zu entfernen. Das gewonnene Zellsediment wurde erneut in 20 ml DMEM-Medium high glucose mit 10 % FBS, 1 % Penicillin / Streptomycin ohne Phenolrot aufgenommen. Zum Schluss wurde ein Teil der Zellen 1:5 verdünnt, in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert. Alle 3 - 5 Tage erfolgte eine erneute Zellpassage. Die verbleibenden Zellen wurden für die Versuche eingesetzt.

3.2.2.2. Transfektion

HEK293-Zellen wurden entweder in eine 24- oder eine 6-Lochplatte ausgesät und für mindestens 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine ausreichende Konfluenz der Zellen zu erreichen. Die Transfektion von Plasmid-DNA mit dem zu untersuchenden Zielgen wurde mit zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. Entweder wurde eine auf Liposomen beruhende Methode oder eine auf Polymerpartikeln beruhende Methode verwendet. Für Erstere wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine® LTX (Invitrogen) mit Plus™-Reagenz eingesetzt. Hierbei wurde für die Transfektion einer Vertiefung einer 24-Lochplatte 0,5 µg Vektor-DNA (1 µg / µl) in 50 µl DMEM high glucose (ohne FBS, Penicillin / Streptomycin oder Phenolrot) verdünnt und 0,5 µl Plus-Reagenz hinzugegeben. Diese Mischung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1,5 µl Lipofectamine-Reagenz versetzt und erneut gut durchmischt. Diese Transfektionslösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Bildung der Transfektionskomplexe zu ermöglichen. Anschließend wurde die Transfektionslösung in das Medium getropft, in dem die Zellen zuvor ausgesät worden waren. Die Zellen wurden dann für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert, sodass die Proteinexpression ein für die Versuche ausreichendes Maß erreichte.

Die zweite Methode wurde nach einem Protokoll von Schirrmann und Büssow durchgeführt (Schirrmann und Büssow, 2010). Hierfür wurde zunächst eine sterile, wässrige Polyethylenimin-Lösung (PEI) (1 mg / ml, pH 7,4) hergestellt. Diese wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Für die Transfektion einer Vertiefung einer 24-Lochplatte wurde 1 µg Vektor-DNA (1 µg / µl) und 4 µl PEI-Lösung jeweils in 30 µl DMEM high glucose ohne FBS, Penicillin / Streptomycin oder Phenolrot verdünnt. Diese Verdünnungen wurden in einer 96-Lochplatte aus Polypropylen angesetzt, weil PEI mit anderen Kunststoffen reagieren kann. Anschließend wurden die beiden Verdünnungen gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung der Transfektionskomplexe zu ermöglichen. Danach wurde die Transfektionslösung auf die Zellen getropft, die zuvor in DMEM high glucose mit 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin in der 24-Lochplatte ausgesät worden waren. Die Zellen wurden dann für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Vorteil dieser Methode ist die hohe Transfektionseffizienz bei HEK293-Zellen verbunden mit einem geringen Kostenaufwand. Allerdings ist die Vitalität der Zellen nach der Transfektion geringer als nach der Transfektion mit Lipofectamine, sodass die Transfektionsmethode entsprechend der Zielsetzung des Versuchs ausgewählt wurde. Für die Perifusionsversuche mit Wirkstoffen wurden die Zellen ausschließlich mit Lipofectamine transfiziert.

3.2.3. Proteinexpression im Sf9 / Baculovirussystem

Viele eukaryotische Proteine werden ko- und posttranslational modifiziert, wodurch Eigenschaften wie die Löslichkeit und die Funktion der Proteine beeinflusst werden können. Das Sf9 / Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine einschließlich der meisten der Modifikationen, die mit Eukaryoten assoziiert werden, und eröffnet die Möglichkeit rekombinante Proteine schnell und effizient in großen Mengen herzustellen. Die rekombinanten Baculoviren wurden mit Hilfe des Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expressions-Systems der Firma Invitrogen hergestellt. Dieses System beruht auf einer homologen Rekombination des Baculovirusgenoms mit einem Transfervektor, der für das rekombinante Protein kodiert. Die Rekombination wird durch eine spezifische Transposition der Vektoren in *E. coli* Zellen unter Verwendung eines Tn7 Transposons durchgeführt.

3.2.3.1. Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9 ist die Bezeichnung für eine immortalisierte Insekten-Zelllinie, die aus Ovar-Zellen der Mottenart *Spodoptera frugiperda* im Puppenstadium isoliert wurde. Diese Zelllinie kann durch Baculoviren infiziert werden und eignet sich daher besonders gut für die Herstellung rekombinanter Proteine auf Basis von Baculoviren.

Sf9-Zellen wurden in Schüttelkultur bei 140 rpm (bei Volumina unter 500 ml) oder bei 80 rpm (bei Volumina ab 500 ml) und 27 °C in Sf-900TM II SFM kultiviert. Dem Medium wurden 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin zugesetzt. Alle 3 - 4 Tage wurden die Zellen durch Verdünnen bei einer Zelldichte zwischen 1×10^6 - 10×10^6 Zellen / ml gehalten.

3.2.3.2. Herstellung rekombinanter Baculoviren

Der Vektor pFastbac-1 enthält einen *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis Virus (AcMNPV) Polyhedrin Promoter, um eine hohe Expressionseffizienz in Insektenzellen zu erreichen. Die Expressionskassette liegt zwischen dem linken und dem rechten Teil des Tn7 Transposons (Tn7L und Tn7R Region) und enthält außerdem ein Resistenzgen für eine Gentamicin-Resistenz sowie ein SV40-Polyadenylierungs-Signal und bildet damit ein mini-Tn7 Transposon. Zunächst wurden die DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Proteine in die Expressionskassette des pFastbac-1 Transfervektors eingebracht (siehe 3.1.8).

Anschließend erfolgte die Transformation, wie unter dem Punkt „Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation“ beschrieben (siehe 3.2.1.1). Allerdings wurde dafür der *E. coli* Stamm DH10BacTM verwendet, der einen Baculovirus-Transportvektor (Bacmid-Vektor bMON14272 (136 kb)) mit einer Anlagerungsstelle für das Tn7 Transposon (mini-attTn7) sowie eine Kanamycin-Resistenz enthält. Die Anlagerungsstelle des Tn7 Transposons liegt innerhalb eines LacZα-Gens, das für eine Galaktosidase

kodiert, ohne dessen Expression negativ zu beeinflussen. Mit Hilfe dieser Galaktosidase sind die Bakterien in der Lage das Substrat Bluo-gal in Anwesenheit des Induktors IPTG zu einem wasserunlöslichen blauen Farbstoff umzusetzen. Dieser Farbstoff färbt Kolonien mit intaktem LacZα-Gen blau (Lac⁺). Nach der Transformation des pFastbac-1 Vektors in DH10BacTM Zellen erfolgt eine Transposition (homologe Rekombination) zwischen dem mini-Tn7 Element des pFastbac-1 Vektors mit dem mini-attTn7 Element des Baculovirus-Transportvektors und es entsteht die rekombinante Bacmid-DNA. Diese Transposition kann jedoch nur mit Hilfe einer Transposase stattfinden, die von einem weiteren Helfer-Plasmid in den DH10BacTM Zellen in trans zur Verfügung gestellt wird. Außerdem kodiert dieses Helfer-Plasmid auch für eine Tetracyclin-Resistenz. Nach der Transposition werden die Bakterien auf einer Agar-Platte ausgestrichen, welche die Antibiotika Tetracyclin (10 µg / ml), Gentamicin (7 µg / ml) und Kanamycin (50 µg / ml) sowie das Substrat Bluo-gal (150 µg / ml) und den Induktor IPTG (40 µg / ml) enthält. Bakterien, in denen die Transposition stattgefunden hat verlieren durch die Zerstörung des LacZα-Gens die Fähigkeit das Substrat Bluo-gal zum blauen Farbstoff umzusetzen (Lac⁻), sodass positiv transponierte Bakterien-Kolonien weiß erscheinen (Lac⁻), nicht-transponierte Bakterien-Kolonien (Lac⁺) hingegen blau. Die weißen Klone wurden selektiert und in 5 ml LB-Medium mit Tetracyclin (10 µg / ml), Gentamicin (7 µg / ml) und Kanamycin (50 µg / ml) vermehrt. Die hochmolekulare rekombinante Bacmid-DNA mit dem Zielgen wurde mit dem unter „Plasmid isolation aus *E. coli*“ beschriebenen Verfahren aus den DH10BacTM Zellen isoliert und gelagert (siehe 3.2.1.2).

Für die Virusherstellung wurden Sf9-Zellen mit der rekombinanten Bacmid-DNA unter Verwendung des Transfektionsreagenz Cellfectin II transfiziert. Die Sf9-Zellen wurden für die Transfektion mit Sf-900TM II SFM Medium ohne FBS und Penicillin / Streptomycin auf eine Zelldichte von 0,4 x 10⁶ Zellen / ml verdünnt. 2 ml dieser Verdünnung wurden in eine 6-Lochplatte gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 8 µl Cellfectin II Reagenz, ein kationisches Lipid, das als Träger für die DNA dient, mit 100 µl Sf-900TM II SFM Medium, ebenfalls ohne FBS und ohne Penicillin / Streptomycin, verdünnt und sorgfältig gemischt. Parallel dazu wurde 1 µg der Baculovirus-DNA in 100 µl Sf-900TM II SFM Medium, ohne FBS und Penicillin / Streptomycin, gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die verdünnte DNA mit dem verdünnten Cellfectin II Reagenz zusammengeführt, vorsichtig gemischt und für 15 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das DNA-Lipid-Gemisch wurde tropfenweise auf die verdünnten Sf9-Zellen geben und bei 27 °C für 3 - 5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionsmischung entfernt und durch 2 ml Sf-900IITM SFM Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin ersetzt. Es folgte eine Inkubation der Sf9-Zellen bei 27 °C im Brutschrank für 3 - 5 Tage je nach Voranschreiten der Virusproduktion im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

Für die Amplifikation der Viren wurden die Sf9-Zellen nach 3 - 5 Tagen mit einem Spatel aus der 6-Lochplatte geschabt und bei 4000 rpm für 2 Minuten und 4 °C vom Medium abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurden anschließend 100 ml neuer Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen / ml infiziert und für 5 - 7 Tage in einem Kolben bei 27 °C und 140 rpm inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde zunächst die Zellviabilität überprüft. Wenn diese unter 40 % lag, wurden die Zellen bei 4000 rpm für 10 Minuten und 4 °C abzentrifugiert und der Virusüberstand durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Millipore) steril filtriert. Für weitere Amplifikationen des Virus wurden 500 ml Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen / ml mit 5 ml Virusüberstand infiziert, für 5 - 7 Tage inkubiert und anschließend wie oben beschrieben abzentrifugiert und steril filtriert.

3.2.3.3. Infektion der Sf9-Zellen

Es wurden je 500 ml Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen / ml mit 50 ml des Virusüberstandes aus den Amplifikationen infiziert. Wenn zwei Viren eingesetzt wurden, zum Beispiel, um die beiden Untereinheiten der NOsGC gleichzeitig zu exprimieren und damit ihre Heterodimerisierung zu ermöglichen, wurden je 25 ml der Virusüberstände verwendet.

3.2.4. Reinigung der in Sf9-Zellen exprimierten Proteine

3.2.4.1. Probenvorbereitung

Die infizierte Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen überführt und eine Minute bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 15 ml TEA-Lysispuffer, einer PIC-Tablette und 300 µl Avidin (100 µM, 2 µM Endkonzentration) versetzt. Nach Resuspension der Zellen wurden diese dreimal für 16 x 4 sec (Laser Power 50 %) mit dem Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 2070 lysiert, um das Zytoplasma freizusetzen. Anschließend wurde das Homogenat bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Probe für 2 Stunden bei 15000 x g zentrifugiert, um die zytosolische Fraktion zu gewinnen.

3.2.4.2. Affinitätschromatographie

Die rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe der einstufigen Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Ein Affinitätspeptid dient dabei als molekulares Werkzeug, um Proteine in großen Mengen zu reinigen (Schmidt und Skerra, 1993). Der Strep-tag ist eine für diesen Zweck maßgeschneiderte Proteinsequenz aus acht Aminosäuren, die eine hohe Affinität zu dem Protein Streptavidin aufweist (Skerra und Schmidt, 2000). Mit dem Strep-tag fusionierte Proteine können daher aus dem Zytoplasma lysierter Zellen isoliert werden. Die Elution erfolgt selektiv durch die Zugabe von Biotinderivaten wie D-Desthiobiotin, die an dasselbe Motiv des Streptavidins binden wie der Strep-tag. Vorteile des

Systems sind die robuste und wiederverwendbare Affinitätsmatrix mit einem sehr geringen unspezifischen Bindungsverhalten für andere zelluläre Proteine und die schonende Elution, welche die Struktur und die Funktion der rekombinanten Proteine in der Regel nicht beeinflusst (Schmidt und Skerra, 1993, 1994). Der biotechnologisch optimierte Strep-tag II mit der Sequenz WSHQPFEK bindet mit besonders hoher Affinität an das auf die Erkennung des Strep-tag II optimierte Streptavidinderivat Strep-Tactin® (Schmidt und Skerra, 2007). Die Reinigung der Strep-tag II fusionierten NOsGC erfolgte wie von Kraehling et al. beschrieben (Kraehling et al., 2011). Die Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe eines ÄKTA Purifier 100 bei einer Flussrate von 1 ml / min durchgeführt. Es wurde eine Tricorn™ 10 / 20 Säule mit Strep-Tactin® Superflow® high capacity Säulenmaterial mit einem Volumen von 2 ml verwendet. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 10 Säulenvolumina des Waschpuffers wurde die Probe aufgetragen. Anschließend wurde die Säulen mit 10 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen, um schwachgebundene Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 5 Säulenvolumina des D-Desthiobiotin enthaltenden Elutionspuffers und das Eluat wurde in Fraktionen von 500 µl gesammelt. Die Fraktionen, die eine Absorption bei 280 nm (Absorption von Tryptophanen und Tyrosinen in Proteinen) und bei 430 nm (Absorption der Häm-Gruppe) aufwiesen, wurden vereinigt und in einem Zentrifugationsfilter mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa (Amicon Ultra, 15 ml) auf ein Volumen von 500 µl eingengt. Aus ca. 500 ml Zellsuspension konnte nach weiterem Einengen der vereinigten Fraktionen auf 20 µl eine Proteinkonzentration von 5 µg / µl erreicht werden. Sowohl der Waschpuffer als auch der Elutionspuffer enthielten 1 M NaCl, um die Stabilität der NOsGC zu erhöhen (Stone und Marletta, 1995). Das Säulenmaterial wurde mit 15 Säulenvolumina des Regenerationspuffers gespült, der den für die Verdrängung des D-Desthiobiotin notwendigen Azofarbstoff 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure (HABA) enthielt. Anschließend wurde erneut mit 20 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Nach diesem Waschschrift konnte das Säulenmaterial für die nächste Reinigung verwendet werden.

3.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der Zytosole wurden nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Diese Methode beruht auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Die Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 zu 595 nm, sodass die Proteinkonzentration über einen Anstieg der Absorption bei 595 nm quantifiziert werden kann. Bei jeder Messung wurde eine Kalibriergerade aus Proben mit einer Konzentration von 12,5 - 400 µg / ml Rinderserumalbumin (BSA) mitgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden zunächst 1:10 oder 1:100 mit PBS verdünnt. Für alle Proben und Standards wurde eine

Dreifachbestimmung durchgeführt. Dafür wurden je 10 µl der Probenverdünnung und der Standard-Lösungen in drei Vertiefungen einer 96-Lochplatte pipettiert und diese anschließend mit 190 µl Bradford Reagenz (Roti Quant®) versetzt. Die 96-Lochplatte wurde mit dem Sunrise™ Absorbance Reader bei einer Absorption von 595 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen der Proben mit Hilfe der BSA Kalibriergeraden berechnet.

Die Konzentrationen der gereinigten Proteine wurden mit dem NanoPhotometer® bei einer Absorption von 280 nm bestimmt. Bei dieser Methode ist die benötigte Probenmenge deutlich geringer als bei der Methode nach Bradford, sodass für alle weiteren Messungen ausreichend Protein vorhanden war.

3.2.6. SDS-PAGE und Western Blot

Die gereinigten Proteine und die zytosolischen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Dafür wurden die Konzentrationen der jeweiligen Proben bestimmt und diese so mit PBS verdünnt, dass die gereinigten Proteine eine Konzentration von 0,1 µg / µl und die Zytosole eine Konzentration von 5 - 12 µg / µl aufwiesen. Die Proben wurden mit dem 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 3 Minuten bei 99 °C gekocht. Anschließend wurde 1 µl Bromphenolblau-Lösung zugesetzt. Die verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus einem 10 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel. Die eingesetzten Kämme gaben 10 Probentaschen vor. Nach dem Gießen wurden die Gele in die Elektrophoresekammer der Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN eingesetzt. Diese wurde mit 1:10 verdünntem 10 x SDS-Laufpuffer gefüllt. 20 µl der vorbereiteten Proben wurden in je eine Tasche pipettiert, sodass von den gereinigten Proteinen 1 µg und von den zytosolischen Proben 50 - 120 µg aufgetragen wurden. Für die Molmassenbestimmung wurde ein gefärbter Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) und zusätzlich ein ungefärbter Proteinstandard (PageRuler™ Unstained Protein Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 3 - 4 Stunden.

Nach dem Auftrennen der Proteine nach ihrer Größe mit der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer wurde mit einem Semi-Dry Blotter über 12 Stunden bei 250 mA durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Beladungskontrolle durch Färben der Membranen mit Ponceau S. Dazu wurden die Membranen für 2 - 5 Minuten in Ponceau S Färbelösung geschwenkt und danach mit Reinstwasser gewaschen, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Der ungefärbte Proteinstandard wurde auf den Nitrozellulosemembranen markiert und diese anschließend eingescannt. Durch die Inkubation der Membranen in einer 5 %igen Milchpulverlösung in 1 x TBST für 1 Stunde wurden die Membranen entfärbt und freie Proteinbindungsstellen der

Nitrozellulosemembran abgesättigt. Anschließend wurde der erste Antikörper (siehe 3.1.7) in der jeweiligen Verdünnung in TBST auf die Membranen gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit 1 x TBST für jeweils 5 Minuten wurden die Membranen mit dem zweiten, HRP-markierten Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Die Detektion erfolgte nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1 x TBST mit Hilfe des Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate in der ECL Dokumentationsanlage ChemiLux.

3.2.7. Bestimmung der spezifischen Guanylat-Cyclase-Aktivität

Die Aktivität der NO-sensitiven Guanylat-Cyclase und ihrer Mutanten wurde über die Bildung von [α -³²P]cGMP aus [α -³²P]GTP bestimmt. Das gebildete [α -³²P]cGMP wird dabei in einem zweistufigen Verfahren vom restlichen Reaktionsansatz abgetrennt und quantifiziert. Diese Methode wurde von Schultz G. und Böhme E. beschrieben und von verschiedenen Arbeitsgruppen angewendet (Haase et al., 2010b; Hoenicka et al., 1999; Koglin und Behrends, 2003; Stasch et al., 2002c)

Gereinigte Enzyme wurden mit einer Konzentration von 2,5 ng / μ l in einer 0,5 mg / ml BSA-Lösung mit 10 % Glycerin bei -80 °C bis zur Messung gelagert. Die Aktivität von 50 ng gereinigtem Enzym oder unterschiedliche Konzentrationen von Zytosolen aus HEK293- und Sf9-Zellen wurde in einem Volumen von 100 μ l in der Gegenwart von 50 mM Triethanolamin / HCL-Puffer (pH 7,4), 1 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin), 3 mM MgCl₂, 3 mM DTT (Dithiothreitol), 5 mM Kreatinphosphat, 1 mM cGMP, 500 μ M GTP und [α -³²P]GTP sowie 0,025 mg Kreatinphosphokinase bestimmt. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und zur Kontrolle wurden vier Leerwerte ohne Enzym gemessen. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation bei 37 °C gestartet und nach 10 Minuten durch die Zugabe von 500 μ l 125 mM Zinkacetat und 500 μ l 120 mM Natriumcarbonat und der daraus resultierenden Kopräzipitation von Zinkcarbonat und 5'-Nukleotiden abgestoppt und 8 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Die Reinigung des durch die Guanylat-Cyclase gebildeten cGMP wurde durch Auftragen auf eine mit Aluminiumoxid gefüllte Säule durchgeführt, die zuvor mit 2 ml 1 mM Perchlorsäure angesäuert worden war. Nach Waschen der Säule mit 10 ml Wasser wurde das gebundene cGMP mit 5 ml Natriumacetat eluiert und in einem Szintillationsröhrchen mit einem Beckman Coulter Counter (LS 6500) und einer Zählzeit von 2 Minuten gemessen. Die Basalwerte wurden in Anwesenheit von 1 mM NaOH gemessen, weil für die NO-Stimulation DEA/NO in 10 mM NaOH gelöst wurde (siehe 3.1.4 Stammlösungen). Für die stimulierten Messungen wurden folgende Wirkstoffe in den jeweiligen Konzentrationen eingesetzt: Cinaciguat (10 μ M), BAY 41-2272 (100 μ M), BAY 41-8543 (100 μ M) und DEA/NO (100 μ M). Für die Dosis-Wirkungskurven wurden Konzentrationen von DEA/NO von 1 nM bis 100 μ M DEA/NO

und 0,1 nM bis 100 µM Cinaciguat verwendet. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$v = \frac{(C - C_0)}{C_t} \times \frac{S}{W \times RG \times P \times t}$$

v	spezifische Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]
C	Zählrate der Probe [cpm]
C ₀	Zählrate des Leerwerts [cpm]
C _t	Zählrate des eingesetzten [α- ³² P]GTP [cpm]
S	Substratmenge (GTP) pro Ansatz [nmol]
W	Wiederfindungsrate von [³² P]cGMP
RG	Reinheitsgrad des [α- ³² P]GTP
P	Proteinmenge pro Ansatz [mg]
t	Inkubationszeit [min]

3.2.8. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) beschreibt einen physikalischen Vorgang bei dem Energie zwischen zwei Fluorophoren, einem Donor- und einem Akzeptor-Fluorophor, bis zu einer Distanz von 90 Å übertragen werden kann (Lakowicz, 1999). Die Theorie des FRET geht auf Theodor Förster zurück, der 1948 postulierte, dass die Effizienz des Energieübertrags mit der reziproken sechsten Potenz vom Abstand der beiden Fluorophore abhängig ist. Diese Abhängigkeit wurde in Fluoreszenzstudien an Donor-Akzeptor-Paaren mit definiertem Abstand bestätigt (Latt et al., 1965; Stryer und Haugland, 1967). Stryer und Haugland zeigten, dass diese Art des Energietransfers als „Spektroskopisches Lineal“ für die Untersuchung von Abstandsbeziehungen in biologischen Makromolekülen verwendet werden kann (Stryer und Haugland, 1967). Heute ist die Messung von FRET eine weit verbreitete Methode, um Abstände, Interaktionen und Konformationsänderungen von Proteinen zu bestimmen (zur Übersicht: Chen et al., 2003; Clegg, 1995; Truong und Ikura, 2001).

Der FRET ist durch eine strahlungslose Übertragung von Energie von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf ein Fluorophor im Grundzustand (Akzeptor) gekennzeichnet. Die Energie wird dabei durch eine intermolekulare Dipol-Dipol Wechselwirkung weitergegeben. Das Ausmaß des Energietransfers hängt von der Überlagerung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, der Quantenausbeute des Donors, der relativen Orientierung der Fluorophore bzw. der Dipole zueinander und vom Abstand der Fluorophore zueinander ab (Förster, 1948). Der Abstand der Fluorophore, bei dem 50 % der Energie übertragen wird, wird als Förster Radius R_0 bezeichnet. R_0 liegt meist zwischen 20 und 60 Å und ist spezifisch für jedes Fluorophorenpaar. Der Försterradius kann mit folgender Formel berechnet werden (Förster, 1948; Lakowicz, 1999):

$$R_0^6 = 8,79 \times 10^{23} (\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))$$

κ^2	Orientierungsfaktor
n	Refraktionsindex des Mediums
Q_D	Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$J(\lambda)$	Überlappungsintegral

Der Orientierungsfaktor κ^2 beschreibt die relative Orientierung der Fluorophore zueinander und wird bei Proben mit frei drehbaren Fluorophoren / Dipolen als $\kappa^2 = 2/3$ angenommen, dem Mittelwert aller möglichen Orientierungsfaktoren der beiden Fluorophore (Dale et al., 1979). Der Brechungsindex n des Mediums, das die Fluorophore direkt umgibt, beeinflusst ebenfalls den Energietransfer und wird normalerweise für biologische Proben mit $n = 1,4$ angenommen. $J(\lambda)$, das Überlappungsintegral, gibt die Größe der Fläche wieder mit der sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt.

Wenn der Förster Radius bekannt ist, ergibt sich die FRET-Effizienz E nach folgender Formel (Lakowicz, 1999):

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)}$$

Nach Umstellen der Formel bei bekannter FRET-Effizienz kann der Abstand r der beiden Fluorophore bestimmt werden. Die FRET-Effizienz beschreibt den Anteil der Energie des angeregten Donors, der auf das Akzeptorfluorophor übertragen wird (Lakowicz, 1999). Sie kann aus der Fluoreszenz-Lebenszeit einer reinen Donor-Probe und einer FRET-Probe (siehe 3.2.11.2) oder mit Hilfe der „sensitized emission“ Methode und weiteren Berechnungen (siehe 3.2.9.1) bestimmt werden.

3.2.9. Spektrofluorimetrische Messungen

3.2.9.1. Messungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers

Proteine können mit einer Wellenlänge von 280 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) emittieren je nach Struktur der Proteine Licht mit einer Wellenlänge zwischen 320 - 350 nm. Verwendet man hingegen eine Wellenlänge von 295 nm werden spezifisch nur die Tryptophane zur Fluoreszenz angeregt, weil diese im Gegensatz zu Tyrosinen und Phenylalaninen in diesem Bereich ein zweites Absorptionsmaximum aufweisen (Abbildung 11). Tryptophane weisen je nach Lipophilie ihrer Umgebung Emissionsmaxima zwischen 330 - 350 nm auf. In diesem Bereich absorbiert das fluoreszierende Nukleotid 2'-Mant-3'-dGTP (Absorptionsmaximum bei 350 nm) (siehe 1.4.1) und emittiert selbst bei 450 nm. Das bedeutet, dass sich das Emissionsspektrum der Tryptophane und das Absorptionsspektrum der Mant-Gruppe überlagern und somit eine Voraussetzung für das Auftreten von FRET erfüllt ist (Abbildung 12). Da 2'-Mant-3'-dGTP als Substratanalogon an die katalytische Domäne der NOsGC bindet (Gille et al., 2004; Gille und Seifert, 2003) ist es möglich, dass innerhalb der NOsGC die aromatischen Aminosäuren, im Besonderen die Tryptophane, als FRET-Donatoren fungieren, während 2'-Mant-3'-dGTP als FRET-Akzeptor dient.

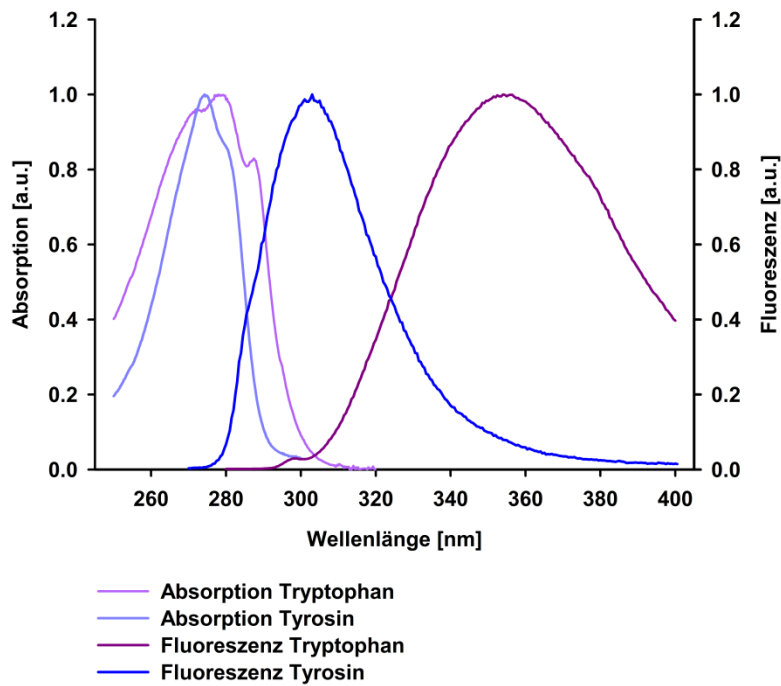


Abbildung 11: Vergleich der Absorptionen und Emissionen von Tryptophan und Tyrosin

Tryptophane können mit einer Wellenlänge von 295 nm spezifisch angeregt werden, weil Tyrosine in diesem Bereich nicht absorbieren.

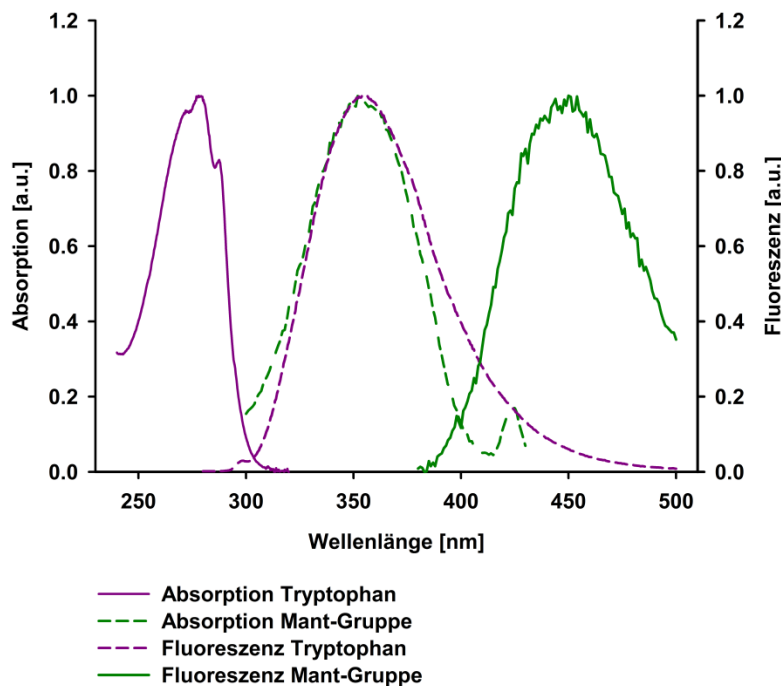


Abbildung 12: Vergleich der Absorptionen und Emissionen von Tryptophan und der Mant-Gruppe

Die Emissionskurve von Tryptophan und die Absorptionskurve der Mant-Gruppe überlappen sich deutlich und erfüllen so eine der Voraussetzungen für FRET.

Eine weitere Voraussetzung für FRET ist der Abstand zwischen den Fluorophoren. Ein Tryptophan, welches sich nicht in räumlicher Nähe zur Mant-Gruppe befindet, kann demzufolge nach einer Anregung bei 295 nm seine Energie nicht auf die Mant-Gruppe übertragen und emittiert die Energie als Fluoreszenz bei seiner spezifischen Wellenlänge von 350 nm (Abbildung 13A). Befindet sich ein Tryptophan jedoch in räumlicher Nähe zur Mant-Gruppe, oder wird es durch Konformationsänderungen in die räumliche Nähe der Mant-Gruppe verschoben, kann ein Energietransfer auf die Mant-Gruppe stattfinden. Diese emittiert dann bei ihrer spezifischen

Wellenlänge von 450 nm. Eine Anregung bei 295 nm resultiert demnach beim Auftreten von FRET in einer Fluoreszenz bei 450 nm, während sich die eigene Fluoreszenz des Tryptophans bei 350 nm verringert (Abbildung 13B). Unter diesen Voraussetzungen ist FRET eine hervorragende Methode, um Abstandsänderungen und Konformationsänderungen in der NOsGC zu messen.

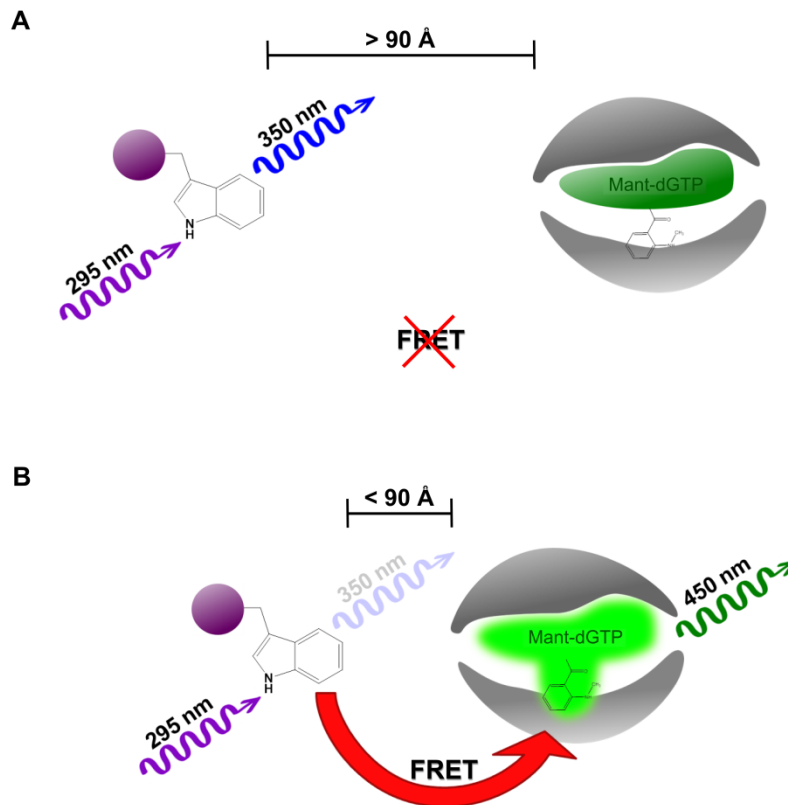


Abbildung 13: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers

A Der Abstand zwischen den Fluorophoren ist zu groß für einen Energieübertrag. Bei einer Anregung mit 295 nm emittiert Tryptophan bei seiner spezifischen Wellenlänge von 350 nm. **B** Befinden sich die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe findet ein Energietransfer von dem angeregten Tryptophan auf die Mant-Gruppe statt. Diese emittiert bei ihrer spezifischen Wellenlänge von 450 nm während die Eigenfluoreszenz des Tryptophans abnimmt.

Für die FRET-Messungen wurden ein Spektrofluorimeter von Varian und eine Quarzküvette der Firma Hellma (Volumen 100 μl) verwendet. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines beheizbaren Küvettenhalters konstant bei 37 $^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Messungen wurden in einem TEA-Puffer mit 50 mM TEA/HCl, 1 mM EDTA und 5 mM Manganchlorid (pH 7,4) durchgeführt. In Untersuchungen an der Adenylat-Cyclase wurde festgestellt, dass die FRET-Signale in Anwesenheit von Mangan-Ionen deutlich stärker sind, als in Anwesenheit von Magnesium-Ionen (Mou et al., 2005). Dies ist vermutlich auf eine höhere Affinität der katalytischen Domäne für Mant-Nukleotide in Anwesenheit von Mangan zurückzuführen (Gille et al., 2004). In einem Endvolumen von 50 μl wurde die gereinigte NOsGC (3 μM) bei einer Temperatur von 37 $^{\circ}\text{C}$ in An- und Abwesenheit von 2'-Mant-3'-dGTP (3 μM) und DEA/NO (100 μM) gemessen. Zunächst wurden Spektren der NOsGC bei einer Anregung von 280 nm und 295 nm aufgenommen, anschließend wurde 2'-Mant-3'-dGTP hinzugegeben und die Spektren erneut gemessen. Nach Zugabe von DEA/NO wurden die Spektren ein weiteres Mal aufgenommen. Die Emission wurde dabei im Bereich von 305 - 500 nm detektiert. Für die Ermittlung des FRET wurde die „sensitized emission“ Methode mit drei Kanälen angewendet (Wallrabe und Periasamy, 2005). Im Donor-Kanal (D) wurde die NOsGC bei 295 nm angeregt und die Emission bei

335 nm detektiert. Im Akzeptor-Kanal (A) wurde 2'-Mant-3'-dGTP bei 335 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 430 nm gemessen. Im FRET-Kanal (DA) wurde die Probe dementsprechend bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt und die Emission bei 430 nm bestimmt. Zur Übersicht siehe Tabelle 1.

	Donor-Kanal (D) Ex 295 / Em 335	Akzeptor-Kanal (A) Ex 335 / Em 430	FRET-Kanal (DA) Ex 295 / Em 430
Donor-Probe (D): NOsGC	I_D^D		I_D^{DA}
Akzeptorprobe (A): 2'-Mant-3'-dGTP		I_A^A	I_A^{DA}
FRET-Probe: NOsGC + 2'-Mant-3'-dGTP	I_{FRET}^D	I_{FRET}^A	I_{FRET}^{DA}
FRET-Probe: NOsGC + 2'-Mant-3'-dGTP + DEA/NO	I_{FRET}^D	I_{FRET}^A	I_{FRET}^{DA}

Tabelle 1: Übersicht der gemessenen Proben und Kanäle.

Zur Benennung: **Intensität^{Kanal}_{Probe}** Die hochgestellten Buchstaben geben den Kanal an (mit Anregungs- und Emissionswellenlänge) in dem gemessen wurde, während die tiefgestellten Buchstaben die Probe angeben, die gemessen wurde.

Berechnung des korrigierten FRET und der FRET-Effizienz

Aus den gemessenen Werten wurde nach der folgenden Gleichung der korrigierte FRET ($FRET^C$) aus dem gemessenen FRET (I_{FRET}) berechnet. (Youvan et al., 1997):

$$FRET^C = I_{FRET} - \left(\frac{I_D^{DA}}{I_D^D} \right) \times I_{FRET}^D - \left(\frac{I_A^{DA}}{I_A^A} \right) \times I_{FRET}^A$$

Aus Tabelle 1 kann die Erläuterung der Bezeichnungen entnommen werden. Die Terme $\left(\frac{I_D^{DA}}{I_D^D} \right)$ und $\left(\frac{I_A^{DA}}{I_A^A} \right)$ beschreiben das Verhältnis der Intensität im FRET-Kanal zur Intensität im Donor- bzw. Akzeptor-Kanal in der reinen Donor- bzw. reinen Akzeptorprobe. Sie geben den Anteil der Emission des Donors („donor bleed through“) und des Akzeptors („acceptor bleed through“) im FRET-Kanal wieder, wenn kein FRET stattfindet. Um den korrigierten FRET zu erhalten wurden diese Werte daher vom gemessenen FRET abgezogen. Aus dem korrigierten FRET wurde die FRET-Effizienz wie folgt berechnet (Wallrabe und Periasamy, 2005):

$$E\% = \left[1 - \left(\frac{I_{FRET}^D}{(I_{FRET}^D + FRET^C)} \right) \right] \times 100$$

3.2.9.2. Mant-Eigenfluoreszenz

Die Messungen der Mant-Eigenfluoreszenz wurden ebenfalls am Spektrofluorimeter von Varian in derselben Quarzküvette durchgeführt wie die FRET-Messungen. Auch bei diesen Messungen wurde die Temperatur mit Hilfe eines beheizbaren Küvettenhalters konstant bei 37 °C gehalten. Die Messungen wurden in einem HEPES-Puffer mit 50 mM, 1 mM EDTA und 3 mM Magnesiumchlorid (pH 7,4) durchgeführt. Im Gegensatz zu den Messungen der FRET-Effizienz, die in Gegenwart von Mn^{2+} durchgeführt werden mussten, konnten die Messungen der Eigenfluoreszenz in Gegenwart des physiologisch relevanten Mg^{2+} durchgeführt werden. In einem Endvolumen von 50 μ l wurde die gereinigte NOsGC (3 μ M) in An- und Abwesenheit von 2'-Mant-3'-dGTP (3 μ M), DEA/NO (100 μ M), Cinaciguat (10 μ M) und BAY 41-8543 (100 μ M) gemessen. Dabei wurde in der gleichen Reihenfolge wie bei den FRET-Messungen vorgegangen. Zunächst wurden Spektren der NOsGC bei einer Anregung von 350 nm und einer Emission von 380 - 500 nm aufgenommen, anschließend wurde 2'-Mant-3'-dGTP hinzugegeben und die Spektren erneut gemessen. Nach Zugabe von DEA/NO, Cinaciguat oder BAY 41-8543 wurden die Spektren ein weiteres Mal aufgenommen. Die Emission wurde dabei im Bereich von 380 - 500 nm detektiert. Parallel dazu wurden Einpunktmessungen bei einer Anregung von 350 nm und einer Emission von 445 nm durchgeführt, die für die Berechnung der prozentualen Änderungen verwendet wurden. Dafür wurde bei jeder Messung auch die 2'-Mant-3'-dGTP (3 μ M) Eigenfluoreszenz gemessen und als Bezugsgröße für die Berechnung des prozentualen Anstiegs verwendet.

3.2.10. Photometrische Messungen

Parallel zu den FRET-Messungen und den Messungen der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe wurde die Absorption der Proben am UV-visible Spektrophotometer Cary 50 gemessen. In einem Endvolumen von 50 μ l wurde die gereinigte NOsGC (3 μ M) in An- und Abwesenheit von DEA/NO (100 μ M) gemessen.

3.2.11. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie wird die Probe mit einem fokussierten Laser zur Fluoreszenz angeregt und die Emission durch Abrastern der einzelnen Bildpunkte detektiert. Im Strahlengang des detektierten Lichts befindet sich eine Lochblende, die für einen hohen Kontrast der Bilder sorgt. Nur das Licht aus der scharf abgebildeten Fokusebene kann die Lochblende passieren während der Durchgang des Lichts aus anderen Ebenen verhindert wird. Die Untersuchungen der mit Fluoreszenzproteinen transfizierten HEK293-Zellen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop-System A1 von Nikon Instruments mit einem inversen Mikroskop (Eclipse Ti) durchgeführt. Für die Steuerung und die Auswertung der Daten wurde die NIS-Elements Microscope

Imaging Software verwendet. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einem 60 x Ölimmersionsobjektiv (Plan Apo VC 60 x Oil DIC N2, NA 1,4; 0,40 µm / px) gemessen.

3.2.11.1. Vierkanalmessung

Für die Untersuchung der Lokalisation der Proteine wurden diese entweder mit dem cyan fluoreszierenden Protein (CFP) oder dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) fusioniert. CFP und YFP sind Derivate des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura et al., 1962). Für die Entdeckung, Weiterentwicklung und Anwendung der fluoreszierenden Proteine wurde 2008 der Nobelpreis für Chemie an O. Shimomura, M. Chalfie und R. Tsien vergeben.

Die Fluoreszenz der Proben wurde mit einem Detektor mit vier unabhängigen Photomultiplikanälen aufgenommen. Dadurch kann eine unspezifische Anregung und Emission der Fluorophore weitgehend verhindert werden. CFP wurde mit einer Wellenlänge von 457 nm (Argon-Laser von Melles Griot) über einen 400-457 / 514 nm dichroischen Spiegel angeregt und mit einem Bandpass-Emissionsfilter für 482 / 35 nm detektiert. YFP wurde mit einer Wellenlänge von 514 nm (Argon-Laser von Melles Griot) über denselben dichroischen Spiegel angeregt und mit einem Bandpass-Emissionsfilter für 540 / 30 nm detektiert. Der abgerasterte Bereich hatte eine Auflösung von 512 x 512 Pixeln und die optische Schichtdicke der konfokalen Aufnahmen lag je nach Einstellung der Lochblende zwischen 0,12 - 0,7 µM. Die optische Auflösung lag bei 0,01 µM.

3.2.11.2. Fluoreszenz-Lebenszeit Messungen

Die Fluoreszenz-Lebenszeit beschreibt die Dauer, die ein Molekül im angeregten Zustand verbleibt, bevor es ein Photon als Fluoreszenzlicht emittiert und in den Grundzustand zurückfällt. Sie ist unabhängig von der Konzentration des Fluorophors und der Anregungsintensität und beträgt bei den meisten verwendeten Fluorophoren nur wenige Nanosekunden. Von besonderem Interesse ist die Fluoreszenz-Lebenszeit beim Auftreten von FRET. Die Anwesenheit eines FRET-Akzeptors in räumlicher Nähe zum Donor führt zur Abnahme der Fluoreszenz-Lebenszeit des Donors. Durch die Messung der Donor-Lebenszeit in An- und Abwesenheit des Akzeptors kann daher die FRET-Effizienz berechnet werden (siehe unten). Die Fluoreszenz-Lebenszeit Messung (FLIM) stellt dementsprechend eine Möglichkeit dar FRET zu detektieren (FRET-FLIM) (Bacsikai et al., 2003; Elangovan et al., 2002). Die Vorteile dieser Methode gegenüber anderen fluoreszenzmikroskopischen Techniken zur Bestimmung von FRET sind, dass die Fluoreszenz-Lebenszeit nicht von der Konzentration der Fluorophore und der Intensität des Anregungslichts abhängt und vom Ausbleichen

der Fluorophore unbeeinflusst bleibt. Zudem wird mit dieser Methode eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung des FRET in lebenden Zellen erreicht (Chen et al., 2003).

Für Untersuchung von Proteininteraktionen mit FRET sind die fluoreszierenden Proteine CFP und YFP eines der am häufigsten verwendeten und am besten etablierten Fluorophorenpaare, bei dem CFP als Donor und YFP als Akzeptor dient (Grailhe et al., 2006). In den durchgeführten Versuchen wurde die α_2 -Untereinheit bzw. das Fusionskonstrukt aus β_1 und α_2 Untereinheit mit EYFP („enhanced“, verbessertes YFP) fusioniert, während der potentielle Interaktionspartner mit ECFP („enhanced“, verbessertes CFP) fusioniert wurde. Die Fluoreszenz-Lebenszeit Messungen wurden mit dem Fluorescence Lifetime Module (LIMO) von Nikon Instruments durchgeführt. Dieser Detektor misst die Fluoreszenz-Lebenszeit basierend auf einer in vier festgelegten Zeitabschnitten gemessenen Photonenmenge (time-domain FLIM). Im Gegensatz zur Vierkanalmessung, bei der eine kontinuierliche Anregung der Fluorophore erfolgte, wird für diese Art der Fluoreszenz-Lebenszeit Messungen eine zeitlich gepulste Anregung benötigt. Bei dem verwendeten System wurde diese Anregung mit einem pulsten Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm von PicoQuant mit einer Frequenz von 40 MHz ermöglicht. Für die Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit wird die Probe mit einem Laserimpuls angeregt und die Abklingkurve der Fluoreszenz des Fluorophors mit dem LIMO gemessen, indem nach einer kurzen Verzögerungsphase (Δt_0) vier elektronische Zähler nacheinander geöffnet und geschlossen werden (Abbildung 14). Die Öffnungsdauer lag bei 2 ns pro Zähler ($\Delta t_{1-4} = 2$ ns). Die Verzögerungsphase ist notwendig, um auszuschließen, dass Anregungslicht auf den Detektor trifft und um die Messung kurzlebiger Autofluoreszenzen der Fluorophore zu unterdrücken. Mit Hilfe der Software EZ-C1 wurden die vier integrierten Intensitätswerte (I_{1-4}) aus den vier Zeitfenstern unter Verwendung eines Algorithmus an eine mono-exponentielle Kurve $I_t = I_0 e^{-t/\tau}$ angepasst (van der Oord et al., 2001). I_0 und I_t sind die Fluoreszenzintensitäten zum Zeitpunkt 0 und t während τ die Fluoreszenz-Lebenszeit in Nanosekunden wiedergibt. Die Bildauflösung betrug 256 Pixel. Für jedes Pixel wurde die Lebenszeit durch die Software berechnet und farbkodiert dargestellt (siehe Abbildung 14). In den Bildern wurden Messbereiche auf einzelne Zellen festgelegt und deren durchschnittliche Fluoreszenz-Lebenszeit bestimmt. Aus den Mittelwerten wurde die FRET-Effizienz nach folgender Formel berechnet (Lakowicz, 1999):

$$E = \left(1 - \left(\frac{\tau_{Probe}}{\tau_{CFP}} \right) \right) \times 100$$

E = FRET-Effizienz [%]
 τ_{CFP} = Fluoreszenz-Lebenszeit der reinen CFP-Probe [ns]
 τ_{Probe} = Fluoreszenz-Lebenszeit der FRET-Probe [ns]

Die FRET-Effizienz beschreibt den Anteil der Energie des angeregten Donors, der auf das Akzeptorfluorophor übertragen wird (Lakowicz, 1999).

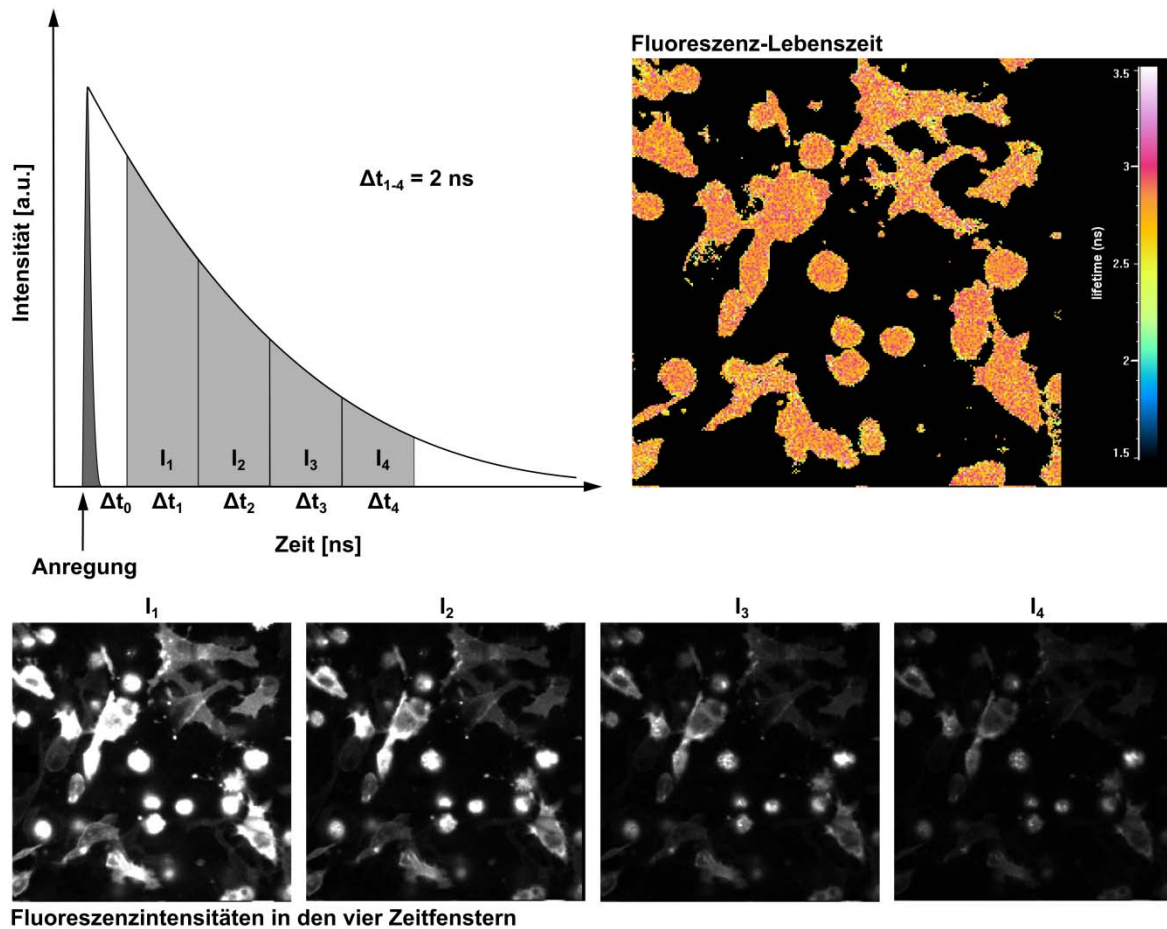


Abbildung 14: Fluoreszenz-Lebenszeitmessung mit dem Fluorescence Lifetime Module (LIMO)

Nach der Anregung der Probe mit einem Laserimpuls werden nach einer kurzen Verzögerungsphase (Δt_0) vier elektronische Zähler nacheinander sequenziell für je 2 ns geöffnet und die Photonen der Abklingkurve der Fluoreszenz des Fluorophors gemessen. Die Signale von mehreren Anregungspulsen werden über die Vermessungsdauer eines Bildpixels integriert. I_{1-4} geben die Fluoreszenzintensität in den Zeitfenstern Δt_{1-4} wieder. Die schwarz-weiß Aufnahmen zeigen die Intensität I_{1-4} der Zellen für die vier Zeitfenster. Aus diesen Werten werden die Abklingkurve und die Fluoreszenz-Lebenszeit für jeden Bildpixel berechnet, die mit Hilfe einer Falschfarbenskala dargestellt wird.

3.2.11.3. Perifusion

Zur Untersuchung der NOsGC-Sensorkonstrukte wurden Langzeitmessungen durchgeführt, bei denen die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von verschiedenen Wirkstoffen detektiert wurde. Die Anregung erfolgte durch einen Argon-Laser von Melles Griot mit einer Wellenlänge von 488 nm, einem dichroischen Spiegel (405 / 488 nm) und einem Bandpass-Emissionsfilter 525 / 50 nm. Um die Phototoxizität zu minimieren wurde mit der Controlled-Light-Exposure Technik (CLEM) gearbeitet (Hoebe et al., 2007). CLEM beruht auf einer diskontinuierlichen Anregung der Probe. Die Menge des Anregungslichtes wird dafür in besonders stark fluoreszierenden Bildabschnitten mit einer hohen Fluorophorendichte und in schwach fluoreszierenden Bereichen, wie dem Hintergrund zwischen den fluoreszierenden Zellen, räumlich begrenzt ausgeschaltet. Für die Kontrolle des Anregungslichtes wird

ein akustooptischer Modulator (AOM) in den Lichtweg eingebracht. Dieser wird durch eine elektronische Schaltung gesteuert, die in Abhängigkeit vom Detektorsignal die nötige Lichtmenge für die darauffolgende Aufnahme berechnet (Hoebe et al., 2007). So konnte bei den durchgeführten Messungen nicht nur die Phototoxizität sondern auch das Ausbleichen der Fluorophore verringert werden und damit eine stabilere, weniger stark abfallende Basislinie erreicht werden ohne dabei an Bildqualität einzubüßen.

Für die Messungen wurden HEK293-Zellen auf einem Deckgläschen (22 mm x 40 mm) mit Hilfe eines Silikonaufsatzes (flexiPERM[®]) mit einer Fläche von 3,1 cm² ausgesät, einen Tag anwachsen gelassen und mit dem zu messenden Konstrukt transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde das Deckgläschen in die Perifusionskammer RC-30 eingesetzt und mit einem Silikoneinsatz ein Kammervolumen von 375 µl festgelegt. Die Kammer wurde ohne Luftteinschlüsse verschlossen und die zu untersuchenden Wirkstofflösungen am Kammereingang angeschlossen. Über ein Ventilsystem und einen Verteiler konnte ohne Verzögerung zwischen verschiedenen Lösungen gewählt werden. Am Kammerausgang wurde eine Spritzenpumpe angeschlossen, mit der die Lösungen in einer festgelegten Flussrate von 100 µl / min durch die Perifusionskammer gesaugt wurden. Die Wirkstoffe wurden in DMEM ohne Zusatz von Penicillin / Streptomycin und FBS gelöst, da dieses zu einer starken Schaumbildung geführt hätte. Alle Lösungen wurden mit CO₂ 5 % begast, um den pH-Wert des Mediums konstant zu halten. Bei den Messungen mit dem Fusionskonstrukt β₁FlnGα₂ wurden den Lösungen der Phosphodiesterasehemmer Zaprinast (100 µM) zugesetzt, um einen Abbau des gebildeten cGMP zu verhindern. Das Mikroskop und alle Lösungen wurden durch eine Inkubationskammer auf 37 °C temperiert. Die Zellen wurden jeweils bei einer Flussrate von 100 µl / min mit dem zellmembrangängigen cGMP-Analogon 8-Br-cGMP, dem NOsGC-Aktivator Cinaciguat oder dem langsam freisetzenden NO-Donor DETA/NO umspült. Für die Messung der Intensitätsänderungen der Zellen wurden Messbereiche in der Fluoreszenzaufnahme festgelegt. Je nach Konstrukt handelte es sich dabei um Messbereiche, die einzelne ganze Zellen oder Teile von Zellen umfassten. Zu Beginn der Messungen wurden die Zellen zunächst mit Medium ohne Wirkstoffe umspült.

3.2.12. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) von n unabhängigen Experimenten angegeben. Die Anzahl der jeweils einbezogenen Experimente wird bei den jeweiligen Abbildungen angegeben. Der zweiseitige Student's t-Test diente zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Proben. Wurden zwei unterschiedliche Proteine verglichen, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, wurde das gleiche Protein zum Beispiel unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen verglichen wurde ein gepaarter t-Test angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1. Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer zwischen NOsGC und 2'-Mant-3'-dGTP

4.1.1. FRET zwischen der unveränderten NOsGC und der Mant-Gruppe

Um zu überprüfen, ob 2'-Mant-3'-dGTP an die NOsGC bindet und als Sensor für Konformationsänderungen verwendet werden kann, wurde die gereinigte NOsGC (α_1S / β_1) entweder mit einer Wellenlänge von 280 nm (Abbildung 15A) oder mit der tryptophanspezifischen Wellenlänge von 295 nm angeregt (Abbildung 15B). Bei beiden Anregungswellenlängen zeigte sich eine Fluoreszenz mit einem Maximum von 335 nm (Abbildung 15, schwarze Linien). Nach Zugabe des Substratanalogons 2'-Mant-3'-dGTP (3 μ M) nahm die Intensität der Fluoreszenz bei 335 nm ab und es trat ein zusätzliches Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei 430 nm auf (Abbildung 15, dunkelgraue Linien). Diese spezifische Änderung der Fluoreszenz weist darauf hin, dass die Tryptophane (W) und Tyrosine der NOsGC ihre Energie auf die Mant-Gruppe übertragen können. Diese aromatischen Aminosäuren fungieren dabei als FRET-Donatoren, während an die NOsGC gebundenes 2'-Mant-3'-dGTP als FRET-Akzeptor dient. Die resultierende basale FRET-Effizienz erreichte bei einer Anregung von 280 nm einen Wert von $12,1 \pm 1,0 \%$ und bei der tryptophanspezifischen Anregung mit 295 nm einen Wert von $5,0 \pm 0,4 \%$ (Abbildung 16). Die NOsGC enthält insgesamt fünf Tryptophane, die gleichmäßig über die unterschiedlichen Domänen verteilt sind. In jeder Domäne befindet sich mindestens ein Tryptophan (Abbildung 17). Diese Verteilung bietet die Möglichkeit den FRET zwischen bestimmten Bereichen der HNOX, PAS, coiled-coil und der katalytischen Domäne und dem Substratanalogon 2'-Mant-3'-dGTP zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden die folgenden FRET-Experimente bei der tryptophanspezifischen Wellenlänge von 295 nm durchgeführt.

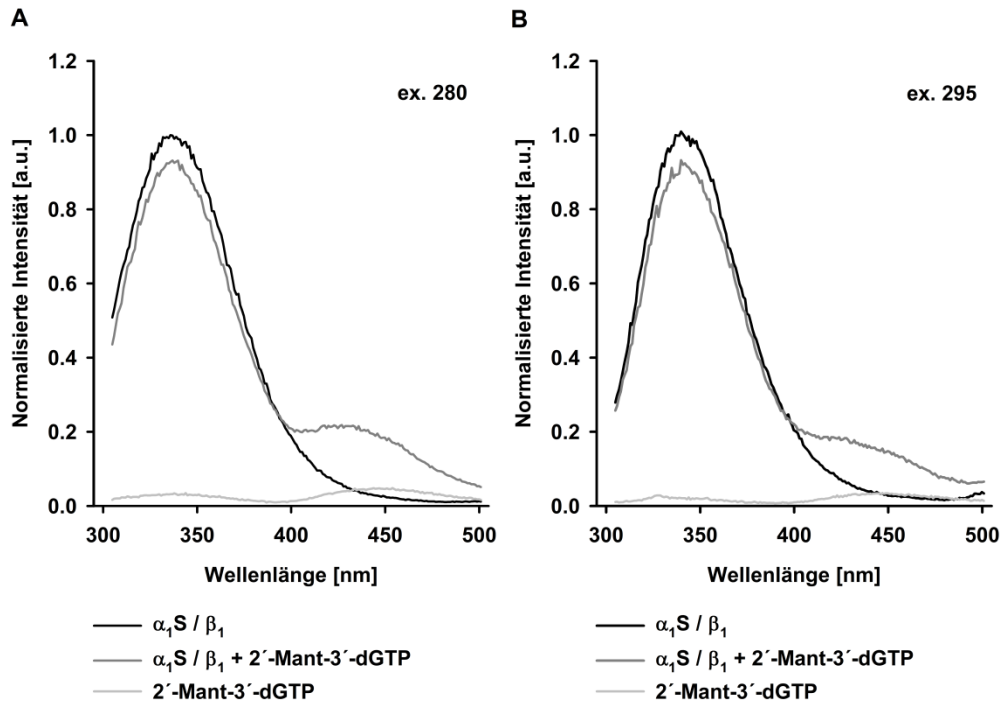


Abbildung 15: Einfluss von 2'-Mant-3'-dGTP auf die Emissionskurve der NOsGC

Dargestellt sind die Emissionskurven der Wildtyp-NOsGC bei **A** einer unspezifischen Anregung von 280 nm und **B** der tryptophanspezifischen Anregung von 295 nm in der Abwesenheit von 2'-Mant-3'-dGTP (schwarze Linien) und in der Anwesenheit von 2'-Mant-3'-dGTP (mittelgraue Linien). Zum Vergleich ist jeweils die reine Emission von 2'-Mant-3'-dGTP aufgetragen. Dargestellt ist eine repräsentative Messung von drei Messungen. Die Werte wurden auf das Emissionsmaximum normalisiert. Durch die Zugabe von 2'-Mant-3'-dGTP zur NOsGC entsteht ein neues Emissionsmaximum bei 430 nm.

4.1.2. NO-induzierter Anstieg der FRET-Effizienz zwischen Tryptophanen und der Mant-Gruppe

Die Zugabe des NO-Donors DEA/NO zur NOsGC mit gebundenem 2'-Mant-3'-dGTP führte bei einer Anregung mit 295 nm zu einem signifikanten Anstieg der FRET-Effizienz um $2,7 \pm 0,1$ % (Abbildung 16). Als Negativkontrolle wurde eine Mutante der NOsGC (α_1S / β_1 H105A) gemessen, deren Aktivität nicht durch NO stimulierbar ist (Wedel et al., 1994). Diese katalytisch NO-insensitive Mutante zeigte nach Zugabe von DEA/NO auch keinen Anstieg der FRET-Effizienz (Abbildung 16). Die Messungen weisen darauf hin, dass es durch die Bindung von NO an die NOsGC zu einer Konformationsänderung kommt, welche die FRET-Effizienz zwischen endogenen Tryptophanen und dem Substratanalogon 2'-Mant-3'-dGTP erhöht. Die FRET-Effizienz nimmt dann zu, wenn sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor verringert (Miyawaki et al., 1997). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass sich ein oder mehrere Tryptophane aufgrund der Aktivierung durch NO auf die Substratbindungsstelle zu bewegen. Sie verringern dabei ihren Abstand zur Mant-Gruppe und es kommt zu dem gemessenen Anstieg der FRET-Effizienz. Vorläufige FRET-Messungen mit CO zeigten keinen Anstieg der FRET-Effizienz, sodass die folgenden FRET-Versuche auf die Stimulation durch NO begrenzt wurden.

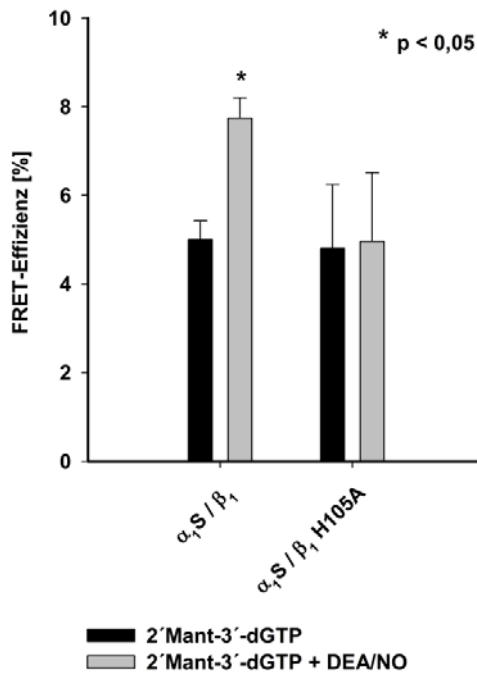


Abbildung 16: Anstieg der FRET-Effizienz durch NO-Stimulation

Dargestellt ist die FRET-Effizienz zwischen 2'-Mant-3'-dGTP und dem Wildtyp-Enzym α_1/β_1 bzw. der hämfreien α_1/β_1 H105A-Mutante unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen) und unter NO-Stimulation (graue Säulen). Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm in Anwesenheit von Mn^{2+} durchgeführt. α_1/β_1 zeigt einen signifikanten Anstieg der FRET-Effizienz durch NO-Stimulation. Im Gegensatz dazu führt NO bei der hämfreien Mutante nicht zu einer Veränderung der FRET-Effizienz. * markiert signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

4.1.3. Mutation der Tryptophane der NOsGC

Die NOsGC der Ratte (*Rattus norvegicus*) enthält insgesamt fünf Tryptophane. Zwei Tryptophane befinden sich in der katalytischen Domäne (α_1 W669, β_1 W602), ein Tryptophan liegt in der Hämbindungsdomäne der β_1 -Untereinheit (β_1 W22) und ein weiteres befindet sich in der PAS-Domäne (α_1 W352). Das fünfte Tryptophan liegt in der coiled-coil Domäne der α_1 -Untereinheit (α_1 W 466). Für die Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie enthält die α_1 -Untereinheit carboxy-terminal den Strep-tag II, in dem sich ein weiteres Tryptophan befindet (Abbildung 17). Aufgrund der geringen Anzahl erschien es realistisch, über Mutationen die Bedeutung einzelner Tryptophane für die NO-induzierte Zunahme der FRET-Effizienz zu klären. Bei jeder der Mutanten wurde eines der Tryptophane durch eine nicht-fluoreszierende Aminosäure (Alanin (A) oder Phenylalanin (F)) ersetzt. Da Phenylalanin, ebenso wie Tryptophan, eine raumfordernde Seitenkette hat, ist im Vergleich zu Alanin die Wahrscheinlichkeit geringer, dass durch die Mutagenese ungewollte Konformationsänderungen entstehen als bei einer Mutation zu Alanin. Abschnitt 3.1.9 gibt einen Überblick über die zur Mutagenese verwendeten Oligonukleotide und die resultierenden Mutanten. Alle Mutanten weisen eine basale Enzymaktivität auf (Abbildung 18, schwarze Säulen, Tabelle 2). DEA/NO führte bei allen Mutanten zu einem Anstieg der cGMP-Produktion (Abbildung 18, graue Säulen, Tabelle 2). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die katalytische Aktivität des Enzyms nach den Punktmutationen der Tryptophane erhalten bleibt, es jedoch zu Abweichungen in der basalen Aktivität und zu unterschiedlich ausgeprägten Einschränkungen der NO-Aktivierbarkeit

kommt. Besonders die Mutante α_1 W466F / β_1 zeigte eine gegenüber dem Wildtyp-Enzym eingeschränkte basale und NO-stimulierte Aktivität (Tabelle 2).

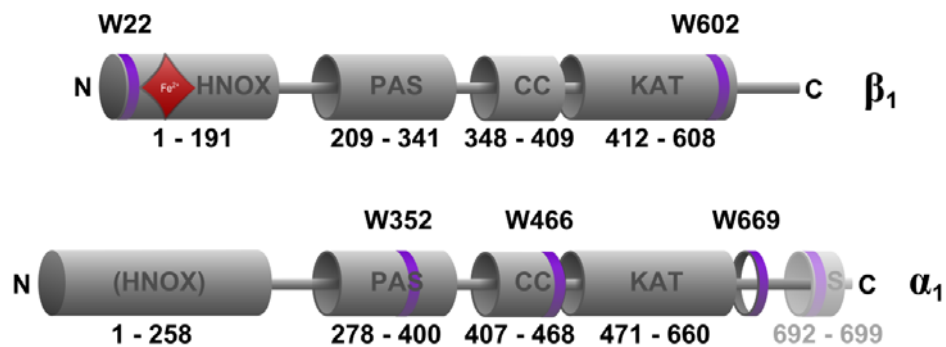


Abbildung 17: Lage der Tryptophane in der NOsGC

Die violetten Ringe markieren die Lage der Tryptophane. Die rote Raute kennzeichnet die Position der Häm-Gruppe in der β_1 -Untereinheit. Die Aminosäuren 692-699 repräsentieren den Strep-tag II (S). Es wurde die Nummerierung der NOsGC der Ratte verwendet. Die schematische Darstellung der funktionellen Domänen wurde aus Abbildung 3 übernommen und beruht auf den dort angegebenen kristallisierten Regionen.

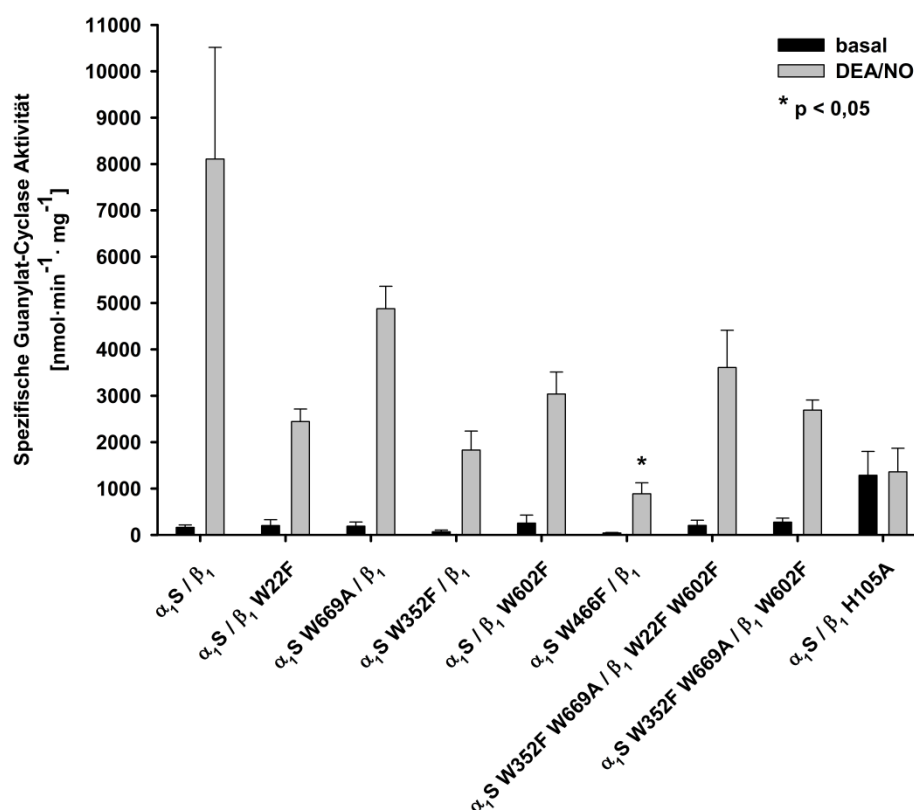


Abbildung 18: Spezifische Aktivität der NOsGC-Mutanten

Spezifische Aktivität der unveränderten NOsGC und der hergestellten Mutanten unter basalen (schwarze Säulen) und NO-stimulierten (graue Säulen) Bedingungen. Alle Mutanten wiesen eine basale Aktivität auf. DEA/NO (100 μ M) führte zu einem Anstieg der cGMP Produktion aller Mutanten. * markiert einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$ beim Vergleich der NO-stimulierten Aktivität der Mutanten mit der NO-stimulierten Aktivität der unveränderten NOsGC. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Enzyme	Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]	
	basal	NO
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$	100	100
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ W22F	79.2 ± 50.2	28.9 ± 3.2
$\alpha_1\text{S}$ W669A / β_1	163.6 ± 54.8	76.8 ± 11.3
$\alpha_1\text{S}$ W352F / β_1	26.7 ± 14.6	21.7 ± 4.8
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ W602F	100.3 ± 69.0	36.0 ± 5.6
$\alpha_1\text{S}$ W466F / β_1	20.1 ± 3.5	12.4 ± 3.2
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W22F W602F	80.5 ± 44.5	42.7 ± 9.5
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W602F	109.1 ± 34.3	31.9 ± 2.6
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ H105A	509.5 ± 203.1	16.1 ± 6.0

Tabelle 2: Vergleich der spezifischen Aktivität der Mutanten mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms
 Angegeben ist der prozentuale Anteil der Aktivitäten der Mutanten von der Aktivität des Wildtyp-Enzyms.

Neben den Aktivitätsmessungen wurden eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und ein Western Blot aller gereinigten Mutanten durchgeführt. Es wurde jeweils die zytosolische Fraktion neben dem gereinigten Protein nach der Affinitätschromatographie aufgetragen. Zu sehen sind bei allen Mutanten die etwa gleichstarken Banden der beiden Untereinheiten ($\alpha_1\text{S}$ Ratte: 82 kDa, β_1 human: 72 kDa) (Abbildung 19). Der Western Blot mit Anti- α_1 -Antikörper (Abbildung 20) und Anti- β_1 -Antikörper (Abbildung 21) bestätigt, dass es sich bei den Banden in der Coomassie-Färbung um die α_1 - bzw. um die β_1 -Untereinheit handelt. Dies zeigt, dass die Affinitätschromatographie über die carboxy-terminal mit dem Oktapeptid Strep-tag II fusionierte α_1 -Untereinheit bei allen Mutanten zur Reinigung des heterodimeren Enzymkomplexes aus der α_1 - und β_1 -Untereinheit führte. Demnach wurde die Dimerisierung der Untereinheiten durch die jeweiligen Mutationen nicht beeinflusst.

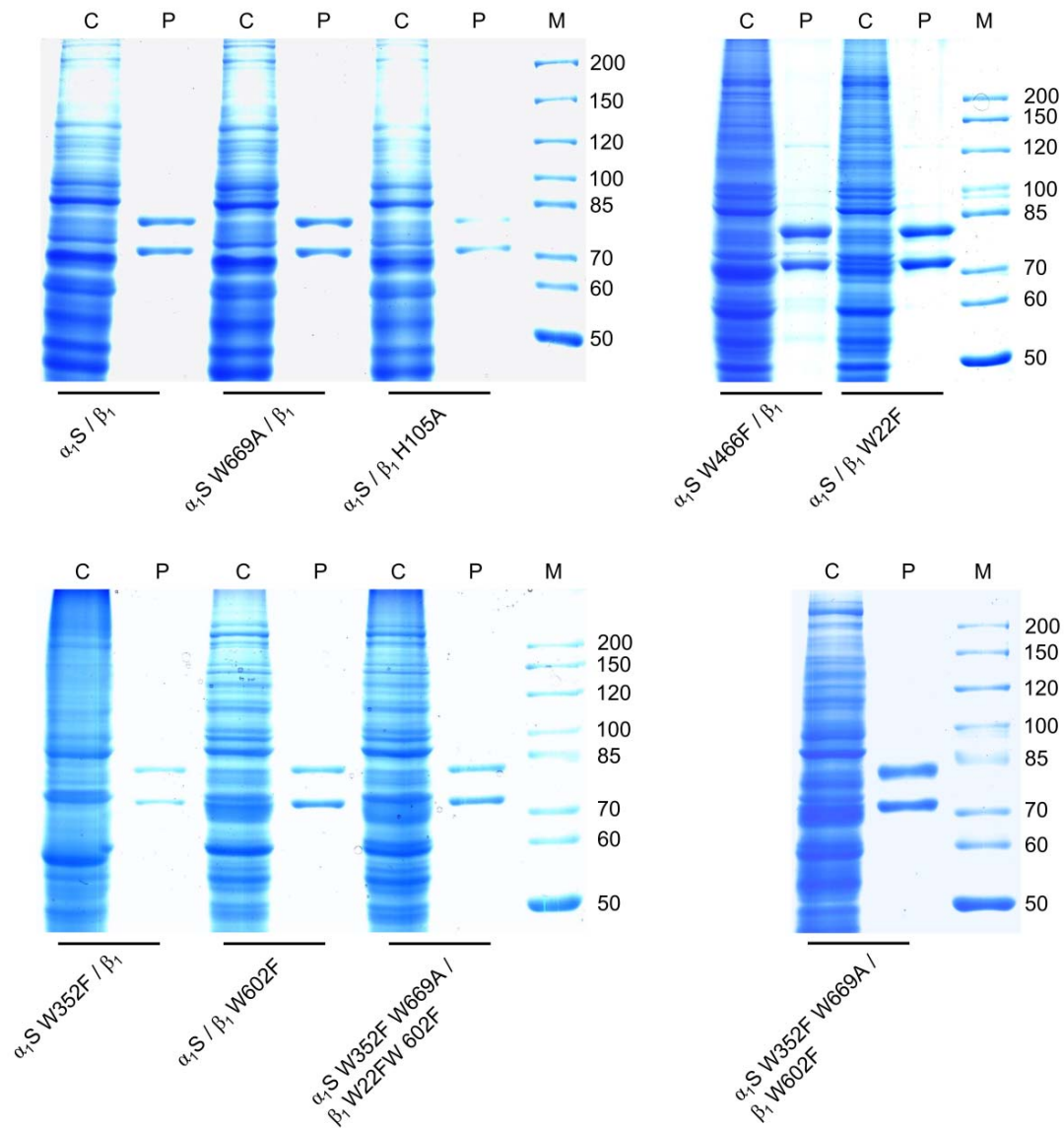


Abbildung 19: SDS-PAGE Analyse von rekombinant exprimierten NOsGC-Mutanten

Die Strep-tag II fusionierte α_1 -Untereinheit (Ratte) hat ein Molekulargewicht von 79 kDa, die humane β_1 -Untereinheit hat eine Größe von 71 kDa. Bei allen Mutanten wurde über die Strep-tag II fusionierte α_1 -Untereinheit gereinigt. In den Coomassie-gefärbten Gelen der gereinigten Proteine sind jeweils gleichstarke Banden für die α_1 - und die β_1 -Untereinheit zu sehen. Demnach wird durch die Mutationen die Heterodimerisierung der Mutanten nicht beeinflusst. Der Vergleich der Spuren der zytosolischen Fraktion und der gereinigten Proteine zeigt, dass durch die Affinitätschromatographie hochreines Protein gewonnen wurde. C: Zytosol (50 μ g), P: gereinigtes Protein (1 μ g), M: Marker [kDa].

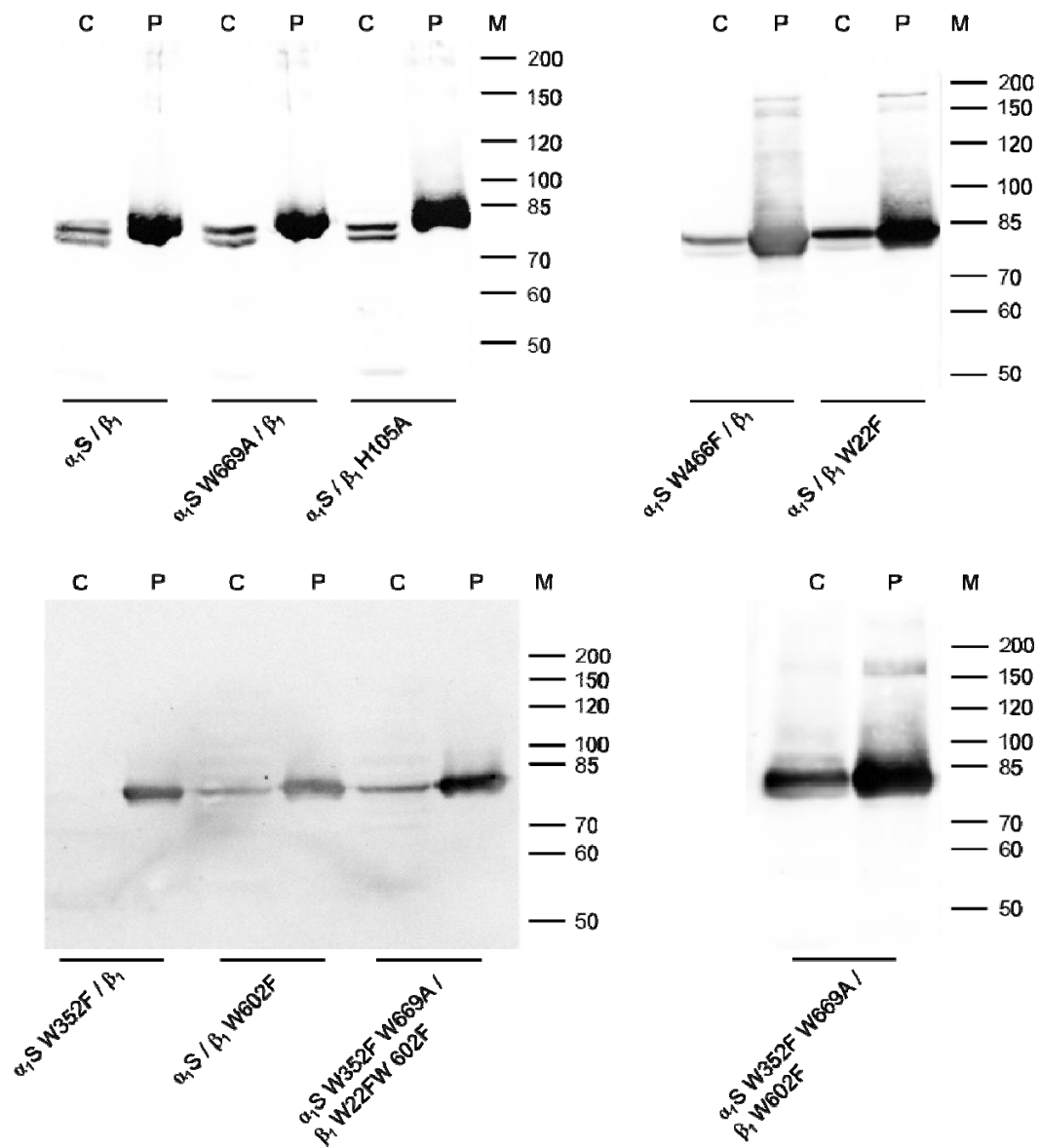


Abbildung 20: Western Blot der aufgereinigten Mutanten mit α_1 -Antikörper

C: Zytosol, P: aufgereinigtes Protein, M: Marker. Die Werte des Markers sind in kDa angegeben.

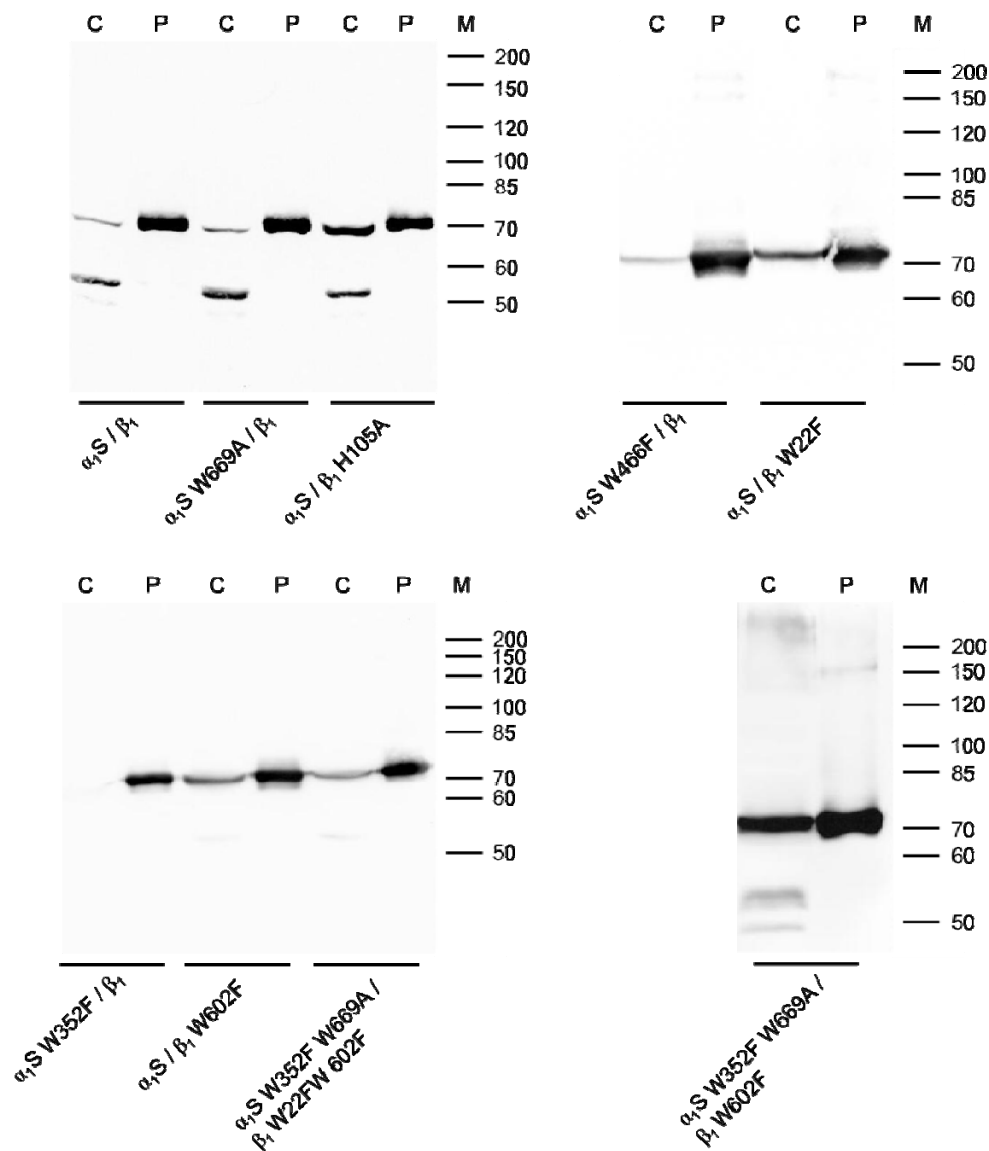


Abbildung 21: Western Blot der gereinigten Mutanten mit β_1 -Antikörper.

C: Zytosol, P: aufgereinigtes Protein, M: Marker. Die Werte des Markers sind in kDa angegeben.

4.1.4. Vergleich der FRET-Effizienzen der unveränderten NOsGC und ihrer Mutanten

Durch den Austausch von je einem Tryptophan wurde jeweils ein möglicher Donor für FRET eliminiert. Falls dieses ausgetauschte Tryptophan am FRET unter basalen Bedingungen beteiligt ist, müsste die basale FRET-Effizienz der Mutante im Vergleich zur unveränderten NOsGC erniedrigt sein. Wie erwartet nahm die FRET-Effizienz der Einzelmутanten unter basalen Bedingungen durch den Austausch der Tryptophane ab (Abbildung 22, Tabelle 3). Die Mutanten der Tryptophane α_1 W352 und α_1 W466 wiesen eine signifikant reduzierte basale FRET-Effizienz auf. Die FRET-Effizienz der Mutanten α_1 S / β_1 W22F, α_1 S W669A / β_1 und α_1 S / β_1 W602F zeigten ebenfalls eine Abnahme. Diese war jedoch nicht statistisch signifikant.

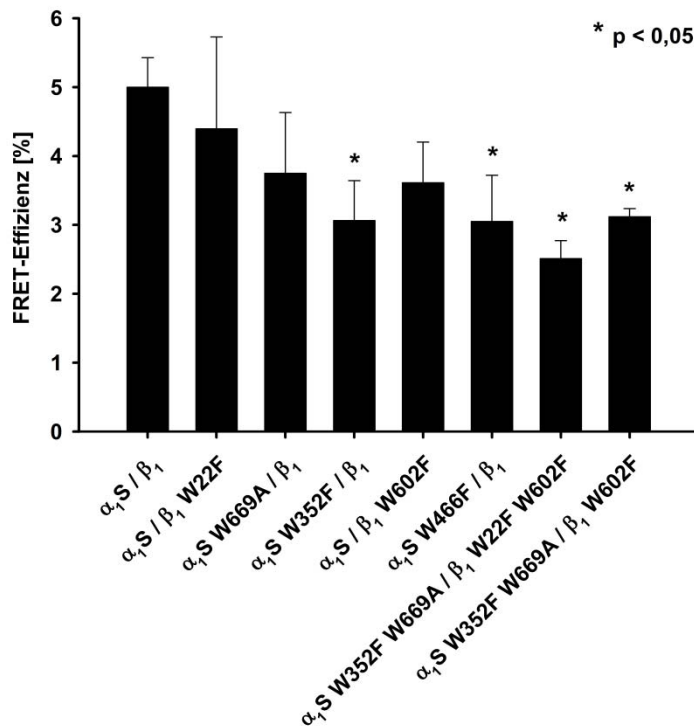


Abbildung 22: FRET-Effizienz der Mutanten unter basalen Bedingungen

Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm in Anwesenheit von Mn^{2+} durchgeführt. * markiert signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Enzyme	FRET-Effizienz [%]	
	basal	NO
α_1S / β_1	5.0 ± 0.4	7.7 ± 0.5
α_1S / β_1 W22F	4.4 ± 1.3	6.5 ± 1.7
α_1S W669A / β_1	3.7 ± 0.9	6.5 ± 1.3
α_1S W352F / β_1	3.1 ± 0.6	5.3 ± 0.9
α_1S / β_1 W602F	3.6 ± 0.6	7.6 ± 0.7
α_1S W466F / β_1	3.0 ± 0.7	4.1 ± 0.6
α_1S W352F W669A / β_1 W22F W602F	2.5 ± 0.3	5.0 ± 0.5
α_1S W352F W669A / β_1 W602F	3.1 ± 0.1	7.0 ± 0.3
α_1S / β_1 H105A	4.8 ± 1.4	5.0 ± 1.6

Tabelle 3: FRET-Effizienzen der Mutanten unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen

Zahlenwerte der in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellten Daten

Unter NO-stimulierten Bedingungen sollte der Anstieg der FRET-Effizienz der Mutanten reduziert sein, wenn das jeweilige fehlende Tryptophan am Anstieg der FRET-Effizienz beteiligt ist. Die Mutanten α_1 W352F / β_1 , α_1 W669A / β_1 und α_1 / β_1 W22F zeigten einen NO-induzierten Anstieg der FRET-Effizienz, der vergleichbar war mit dem des unveränderten Enzyms (Abbildung 23). Der Austausch von W466 der α_1 -Untereinheit führte zu einem statistisch signifikant verminderten FRET-Effizienz-Anstieg in der Gegenwart von NO. Dies deutet darauf hin, dass W466 für den Anstieg der FRET-Effizienz nach NO-Aktivierung verantwortlich sein könnte. Der Austausch von W602 der β_1 -Untereinheit führte überraschenderweise zu einem statistisch signifikant erhöhten NO-induzierten FRET-Effizienz-Anstieg im Vergleich zur unveränderte NOsGC (siehe unten).

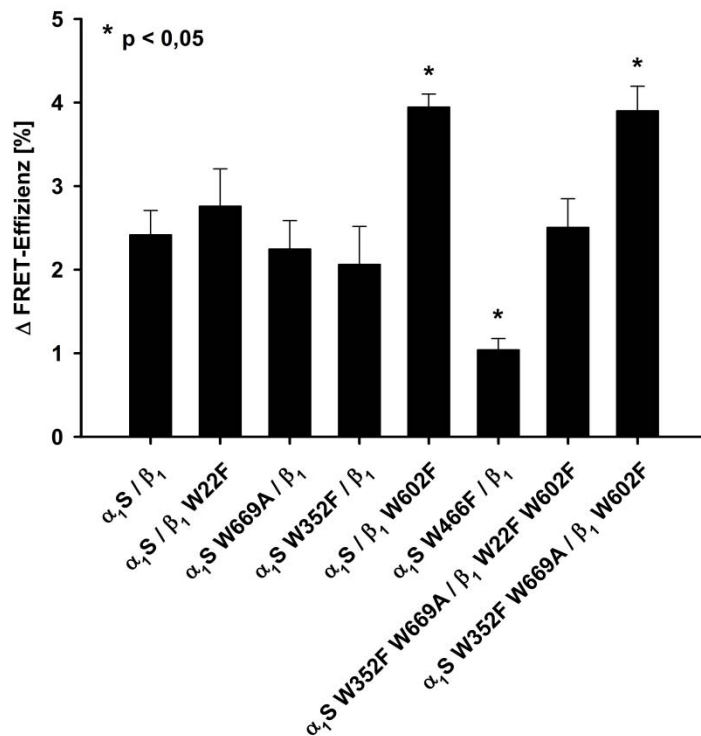


Abbildung 23: Anstieg der FRET-Effizienz der Mutanten durch NO-Stimulation

Aufgetragen ist die Differenz der FRET-Effizienz unter NO-stimulierten (DEA/NO 100 μ M) und basalen Bedingungen (vergleiche Tabelle 1). Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm in Anwesenheit von Mn^{2+} durchgeführt. * markiert signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen.

4.1.5. Tryptophan 466 ist notwendig und ausreichend für den NO-induzierten FRET-Effizienzanstieg des Wildtyp-Enzyms

Die bisherigen Versuche zeigen, dass die Mutation von W466 zu Phenylalanin zu einem signifikanten Abfall der NO-induzierten FRET-Effizienz zwischen Tryptophan und 2'-Mant-3'-dGTP und zu einem starken Abfall der Enzymaktivität führt. Um W466 als direkt verantwortlich für den FRET-Effizienzanstieg der unveränderten NOsGC zu identifizieren, wurde eine weitere Mutante erzeugt: Alle Tryptophane der NOsGC wurden zu Alanin oder Phenylalanin mutiert, mit Ausnahme des W466. Die entstandene Vierfach-Mutante α_1S W352F W669A / β_1 W22F W602F zeigte wie die Einzelmutante eine Reduktion der NO-stimulierten Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Die Reduktion war jedoch deutlich weniger ausgeprägt als für die α_1 W466F / β_1 -Mutante (Abbildung 18). Diese Daten und der Befund, dass die α_1 W466F / β_1 -Mutante einen verminderten NO-stimulierten Anstieg der FRET-Effizienz zeigt, weisen darauf hin, dass W466 nicht nur ein möglicher FRET-Donor ist, sondern maßgeblich an der Aktivierung der NOsGC beteiligt ist. Die basale FRET-Effizienz von α_1S W352F W669A / β_1 W22F W602F erreichte einen Wert von $2,5 \pm 0,3$ % und entsprach damit fast der Hälfte der basalen FRET-Effizienz der unveränderten NOsGC ($5,0 \pm 0,4$ %) (Abbildung 22). W466 trägt demnach maßgeblich zum FRET unter basalen Bedingungen bei. Daraus lässt sich schließen, dass sich das W466 entweder in räumlicher Nähe zur Mant-Gruppe befindet oder

dass die Ausrichtung der beiden Fluorophore zueinander besonders günstig für einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer ist.

Nach Zugabe von DEA/NO zeigte die Vierfach-Mutante einen Anstieg der FRET-Effizienz, der den Wert der unveränderten NOsGC erreichte (Abbildung 23). Da W466 in dieser Mutante der einzige endogene FRET-Donor in der NOsGC für einen Energietransfer auf die Mant-Gruppe ist, lässt sich der Anstieg der FRET-Effizienz der Vierfach-Mutante auf W466 zurückführen. Eine Beteiligung des im Strep-tag vorhandenen Tryptophans nach NO-Stimulation kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, ist jedoch unwahrscheinlich. Die Mutante des W669 der α_1 -Untereinheit, welches nur 23 Aminosäuren vom Strep-tag W entfernt liegt, zeigte weder unter basalen noch unter NO-stimulierten Bedingungen signifikante Unterschiede der FRET-Effizienzen im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (Abbildung 22, Abbildung 23). Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung der Vierfach-Mutante belegen, dass W466 nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für den sichtbaren Anstieg der FRET-Effizienz des Wildtyp-Enzyms ist. Da die FRET-Effizienz ansteigt, wenn sich der Abstand der beteiligten Fluorophore verringert, folgt daraus, dass sich W466 aufgrund der Aktivierung der NOsGC durch NO in Richtung der Substratbindestelle bewegt (Miyawaki et al., 1997). Dabei verringert sich der Abstand zur Mant-Gruppe und es kommt zu dem gemessenen Anstieg der FRET-Effizienz.

4.1.6. Wechselwirkungen zwischen Tryptophan 602 und Tryptophan 22

Überraschenderweise führte der Austausch des W602 der β_1 -Untereinheit zu einem gegenüber der unveränderten NOsGC statistisch signifikant höheren NO-induzierten FRET-Effizienz-Anstieg (Abbildung 23). Dieser Unterschied trat nur unter NO-stimulierten Bedingungen auf, unter basalen Bedingungen zeigten beide Enzyme vergleichbare FRET-Effizienzen (Abbildung 22). Der außergewöhnliche Anstieg der W602-Mutante kann nicht durch W466 verursacht sein, denn der NO-stimulierte Anstieg der Vierfach-Mutante, der ebenfalls das W602 fehlt, unterscheidet sich nicht vom Wert der unveränderten NOsGC. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass sich unter NO-Stimulation neben dem W466 ein weiteres Tryptophan auf die Mant-Gruppe in der Substratbindungsstelle zubewegt. Im unveränderten Enzym könnte die Detektion dieser Bewegung durch eine Interaktion mit W602 verhindert werden. Ein möglicher Kandidat für dieses zweite sich bewegende Tryptophan ist das W22 der HNOX-Domäne von β_1 . In den letzten Jahren veröffentlichte Studien weisen darauf hin, dass sich die katalytische Domäne in räumlicher Nähe zur HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit befindet, sodass der Abstand zwischen dem amino-terminalen W22 und dem carboxy-terminalen W602 möglicherweise gering genug für eine direkte Wechselwirkung ist (Haase et al., 2010c; Winger und Marletta, 2005). Um W22 direkt als das sich zusätzlich bewegende Tryptophan identifizieren zu können, wurde eine weitere Mutante erzeugt, in der nur noch das für die Aktivierbarkeit wichtige

W466 und das W22 enthalten waren. Alle anderen Tryptophane wurden entweder zu Alanin oder Phenylalanin mutiert (α_1 S W352F W669A / β_1 W602F). Diese Dreifach-Mutante unterscheidet sich von der Vierfach-Mutante nur durch die zusätzliche Anwesenheit des W22. Falls sich W22 zusätzlich zu W466 unter NO-Stimulation auf die Mant-Gruppe zubewegt, sollte die FRET-Effizienz der Dreifach-Mutante den Wert der α_1 S / β_1 W602F-Mutante erreichen. Abbildung 23 zeigt, dass dies tatsächlich der Fall ist: In Gegenwart von NO übersteigt die FRET-Effizienz der Dreifach-Mutante den Wert der unveränderten NOsGC signifikant und erreicht den Wert der α_1 S / β_1 W602F-Mutante. Demnach bewegen sich W466 und W22 durch NO-Stimulation auf die Mant-Gruppe in der Substratbindestelle zu. Im Wildtyp-Enzym wird dabei die Bewegung des W22 durch eine Wechselwirkung mit W602 maskiert.

Eine mögliche Wechselwirkung zwischen Tryptophanen in Proteinen ist Homo-FRET. Dieser beschreibt den Energietransfer zwischen zwei gleichen Fluorophoren, wie zum Beispiel den Energietransfer von einem Tryptophan auf ein zweites Tryptophan (Lakowicz, 1999). In wässriger Lösung liegen das Emissionsspektrum und das Absorptionsspektrum von Tryptophan so weit auseinander, dass sie sich nicht überschneiden. In einer unpolaren Umgebung verschiebt sich das Emissionsspektrum des Tryptophans nach links zu kürzeren Wellenlängen. Dadurch überlappt sein Emissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum anderer Tryptophane. Liegen unter diesen Voraussetzungen zwei Tryptophane in räumlicher Nähe kann es zum Homo-FRET kommen. Das bedeutet, dass Tryptophane den Energietransfer anderer Tryptophane auf die Mant-Gruppe hemmen bzw. reduzieren können. Um eine mögliche Verschiebung der Emission zu kürzeren Wellenlängen festzustellen, wurde das Emissionsmaximum des unveränderten Enzyms mit den Emissionsmaxima der Dreifach- und der Vierfach-Mutante bei einer Anregung von 295 nm verglichen (Abbildung 24). Das Emissionsmaximum des unveränderten Enzyms lag bei $340,5 \pm 1,0$ nm. Das Emissionsmaximum der Vierfach-Mutante, das der Emission von W466 entspricht, lag bei $342,5 \pm 1,5$ nm und zeigt, dass das W466 in einer polaren bzw. lösungsmittel-exponierten Umgebung liegt. Das Emissionsspektrum der Dreifach-Mutante, welches ein Mischspektrum aus der Emission des W466 und W22 darstellt, zeigte ein signifikant nach links verschobenes Emissionsmaximum ($336,7 \pm 0,8$ nm). Das bedeutet, dass sich das W22 in einer unpolaren Umgebung befindet, als die restlichen Tryptophane und damit die Voraussetzung für ein Homo-FRET mit dem W602 erfüllt. Unter NO-stimulierten Bedingungen gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Emissionsmaxima unter basalen Bedingungen, sodass man davon ausgehen kann, dass sich die Polarität der Umgebung der Tryptophane durch die NO-stimulierte Konformationsänderung nicht verändert. Kosarikov et al. kamen in ihren Fluoreszenzanregungsversuchen am Wildtyp-Enzym zu dem gleichen Schluss: Das Emissionsmaximum der NOsGC verschob sich durch NO-Stimulation nicht und die Autoren schlossen daraus, dass sich die Polarität der Umgebung der Tryptophane nicht verändert (Kosarikov et al., 2001).

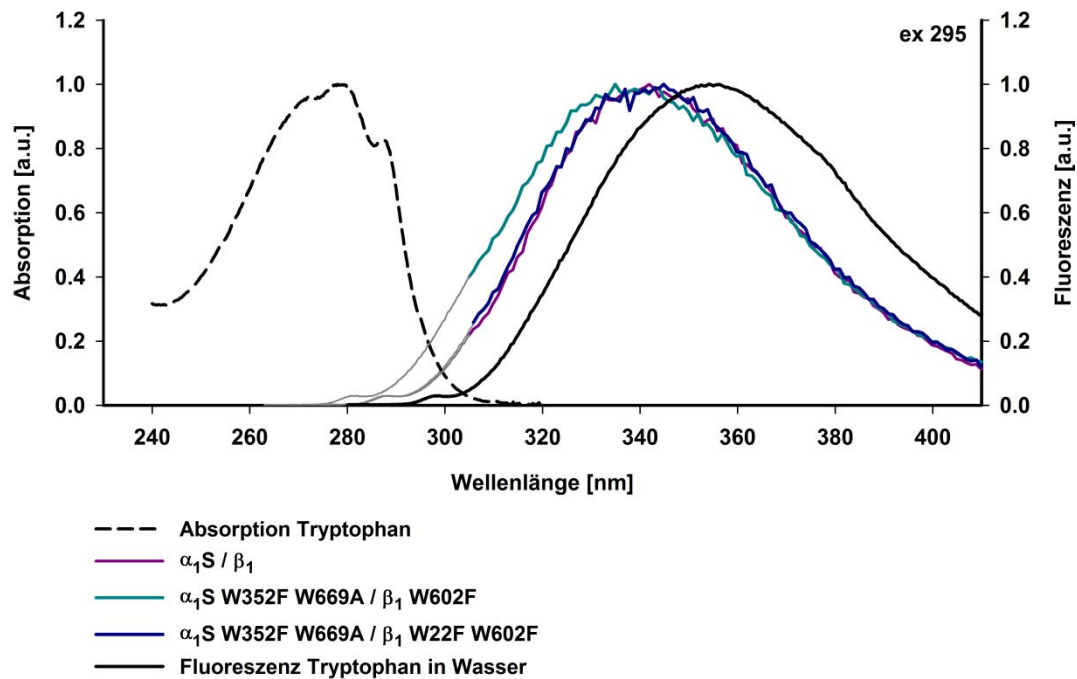


Abbildung 24: Vergleich der Emission der Dreifach- und Vierfach-Mutante und des Wildtyp-Enzyms

Die Emissionskurve der Dreifach-Mutante ist im Vergleich zu den Emissionskurven der Vierfach-Mutante und dem Wildtyp-Enzym zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Die Emission der Vierfach-Mutante entspricht der Emission von Tryptophan 466 während die Emissionskurve der Dreifach-Mutante einem Mischspektrum aus der Emission des Tryptophans 466 und 22 darstellt. Das bedeutet, dass sich Tryptophan 22 in einer unpolareren Umgebung befindet, als die restlichen Tryptophane und damit die Voraussetzung für ein Homo-FRET mit dem Tryptophan 602 erfüllt.

Unter basalen Bedingungen war die FRET-Effizienz der Dreifach-Mutante vergleichbar mit der FRET-Effizienz der Vierfach-Mutante. Die FRET-Effizienz der Vierfach-Mutante spiegelt dabei den Anteil des W466 am FRET unter basalen Bedingungen wider. Die FRET-Effizienz der Dreifach-Mutante gibt den Anteil von W466 und W22 wieder. Da die Werte für die basalen FRET-Effizienzen der beiden Mutanten nicht signifikant unterschiedlich sind, obwohl die Dreifach-Mutante zusätzlich zum W466 das W22 enthält, ist W22 nicht am FRET unter basalen Bedingungen beteiligt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Einzelmutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1$ W22F. Unter basalen Bedingungen zeigt diese keine signifikante Reduktion der FRET-Effizienz. Dies weist ebenfalls darauf hin, dass W22 nicht am FRET unter basalen Bedingungen beteiligt ist. Daher ist entweder der Abstand des W22 in der HNOX-Domäne von β_1 zur Mant-Gruppe in der katalytischen Domäne zu groß für einen Energietransfer, oder W22 wird durch andere FRET-Akzeptoren abgeschirmt (siehe Diskussion). Desweiteren erklärt diese Beobachtung, dass der Homo-FRET nur unter NO-stimulierten Bedingungen eine Rolle spielt und die Mutante α_1 / β_1 W602F nur unter NO-stimulierten Bedingungen eine Erhöhung der FRET-Effizienz zeigt.

4.1.7. Unveränderte Hämbindungseigenschaft aller Tryptophan-Mutanten

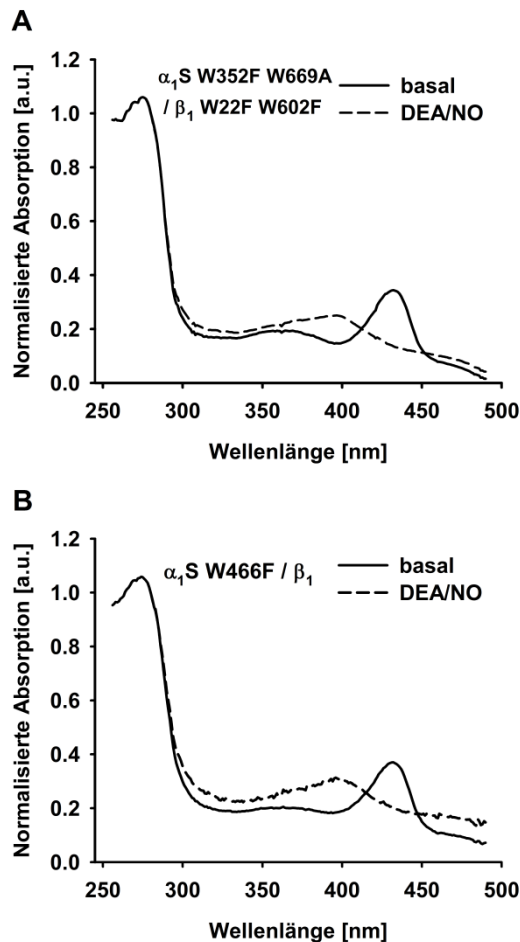


Abbildung 25: Absorption der komplementären Mutanten

Die Absorptionsspektren von α_1 S W466F / β_1 und α_1 S W352F W669A / β_1 W22F W602F wurden unter basalen und NO-stimulierten (100 μ M DEA/NO) Bedingungen gemessen. Beide Mutanten enthalten Häm und zeigen unter NO-Stimulation die typische Verschiebung der Soret Bande von 430 nm zu 399 nm. Dargestellt ist jeweils die normierte Absorption einer repräsentativen Messung von drei Messungen.

NO-Dosis-Wirkungskurven von α_1 S / β_1 , α_1 W352F W669A / β_1 W22F W602F und α_1 W466F / β_1 zeigen, dass NO das Wildtyp-Enzym und beide Mutanten konzentrationsabhängig von 1 nM bis 100 μ M aktiviert. Die x-fach Stimulation von α_1 W466F / β_1 war jedoch wesentlich niedriger als die x-fache Stimulation des Wildtyp-Enzyms und der α_1 S W352F W669A / β_1 W22F W602F Mutante (Abbildung 26A). Die EC_{50} -Werte für die NO-Aktivierung von α_1 S W352F W669A / β_1 W22F W602F (214 ± 47 nM) und α_1 S W466F / β_1 (497 ± 223 nM) waren nicht signifikant unterschiedlich zum EC_{50} -Wert des Wildtyp-Enzyms (337 ± 52 nM) (Abbildung 26B). Die Ergebnisse belegen, dass die Bindungsaffinität von NO an die Häm-Gruppe in der α_1 S W466F / β_1 -Mutante nicht verändert ist.

Eine denkbare Ursache für den Abfall der maximalen Aktivität unter NO-stimulierten Bedingungen ist der Verlust der Häm-Gruppe. Die Häm-Absorptionsspektren von α_1 W466F / β_1 und α_1 W352F W669A / β_1 W22F W602F wurden daher mit und ohne DEA/NO gemessen (Abbildung 25). Die Ergebnisse belegen, dass beide Enzyme Häm enthalten und dass NO an das Häm beider Enzyme bindet. Die Soret Bande des Häms zeigt den typischen Wechsel von einem Maximum bei 430 nm unter basalen Bedingungen zu 399 nm unter NO-stimulierten Bedingungen. Dies zeigt, dass W466 weder einen Einfluss auf die Bindung von Häm an die NOsGC, noch auf die Bindung von NO an das Häm der NOsGC hat. Dasselbe gilt für alle bisher in diesem Kapitel beschriebenen Mutanten mit Ausnahme der β_1 H105A-Mutante. Auf die Darstellung der Absorptionskurven jeder Mutante wird verzichtet, weil die Vierfach-Mutante vier Mutationen vereint. Die Absorptionskurven der Vierfach-Mutante unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen unterscheiden sich nicht vom Wildtyp-Enzym (vgl. Abbildung 25 und Abbildung 36A).

Um zu untersuchen, ob W466 einen Einfluss auf den EC_{50} für NO hat, wurde die Abhängigkeit der Aktivierung von der NO-Konzentration bestimmt. Die

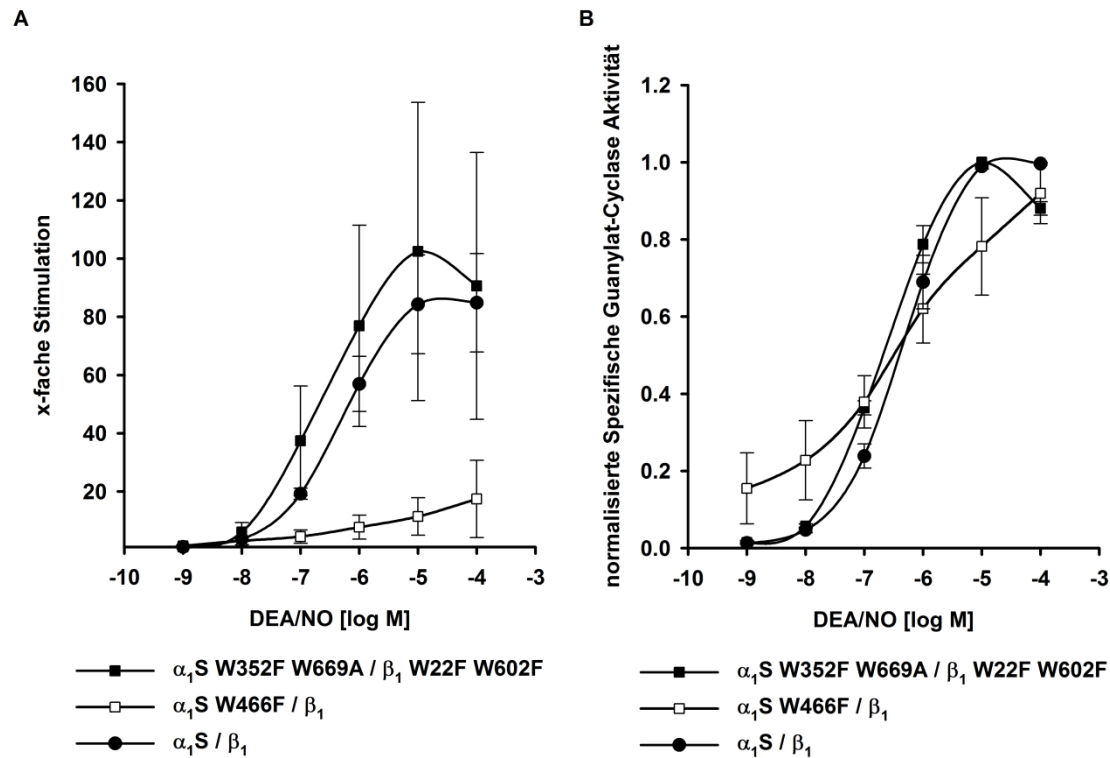


Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve von DEA/NO

Der konzentrationsabhängige Effekt von NO auf α_1 S W352F W669A / β_1 W22F W602F (schwarzes Quadrat) und α_1 S W466F / β_1 (weißes Quadrat) wurde in einem Bereich von 1 nM bis 100 μ M DEA/NO gemessen. NO aktiviert beide Mutanten konzentrationsabhängig. Der EC_{50} -Wert für DEA/NO der α_1 S W352F W669A / β_1 W22F W602F Mutante (214 ± 47 nM) und der α_1 S W466F / β_1 Mutante (497 ± 223 nM) war nicht signifikant unterschiedlich zum EC_{50} -Wert des Wildtyp-Enzyms (337 ± 52 nM). Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

4.1.8. Regeneration der NO-stimulierten Aktivität durch BAY 41-2272 und BAY 41-8543

Um zu untersuchen ob α_1 W466 auch an der Signaltransduktion von nicht NO-freisetzenden Stimulatoren der NOsGC beteiligt ist, wurden vergleichende Aktivitätsuntersuchungen mit α_1 S W466F / β_1 , der komplementären Vierfach-Mutante und der Dreifach-Mutante durchgeführt. Abbildung 27 und Tabelle 4 zeigen, dass neben der NO-Aktivierung auch die Aktivierung durch die NOsGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 im Vergleich zum Wildtyp-Enzym reduziert ist. Die NO-Aktivierung von α_1 S W466F / β_1 war auch im Vergleich zur Vierfach- und Dreifach-Mutante signifikant erniedrigt. Überraschenderweise führten die NOsGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 zu einer besonders ausgeprägten Stimulation der NO-Aktivierung dieser Mutante. Betrachtet man die x-fache NO-Stimulation des Wildtyp-Enzyms und der Mutanten durch die NOsGC-Stimulatoren wird das Ausmaß dieses Regenerationseffekts deutlich (Einfügung Abbildung 27). Die NO-stimulierte Aktivität von α_1 S W466F / β_1 wurde durch den Stimulator BAY 41-8543 um das 8,4-fach erhöht, während die NO-stimulierte Aktivitäten des Wildtyp-Enzyms und der Vierfach-

Mutante durch den NOsGC-Stimulator nur verdoppelt wurden (siehe Tabelle 4). Die Abwesenheit von W466 führt demnach nicht zu einem vollständigen Verlust der Funktion des Enzyms, sondern setzt die Effektivität der NO-Signalweiterleitung herab, die durch BAY 41-2272 und BAY 41-8543 wieder hergestellt werden kann. Die direkte Beteiligung des W466 an der Weiterleitung des Aktivierungssignals ist demnach sehr wahrscheinlich. Keine der anderen Einzelmutanten (W669, W352, W22, W602) zeigten diesen ausgeprägten Regenerationseffekt durch die Stimulatoren. BAY 41-8543 führte zu einer Verdreifachung ihrer NO-Aktivierung.

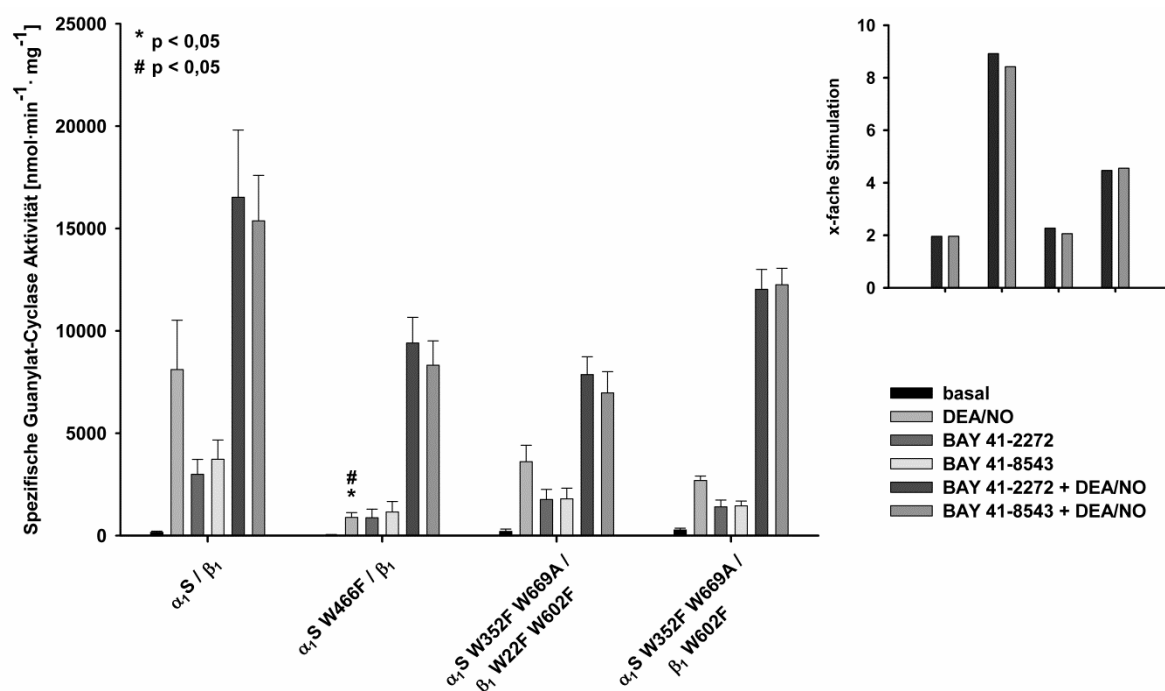


Abbildung 27: Einfluss der NOsGC-Stimulatoren auf die NO-stimulierte Aktivität

A Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität unter basalen Bedingungen, NO-Stimulation (DEA/NO 100 µM), BAY 41-2272 (100 µM), BAY 41-8543 (100 µM), BAY 41-2272 + DEA/NO (je 100 µM) und BAY 41-8543 + DEA/NO (je 100 µM). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. * markiert p-Werte < 0,05 im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. # markiert p-Werte < 0,05 im Vergleich zur Dreifach- oder Vierfach-Mutante. **Einfügung** Darstellung der mittleren x-fachen Stimulation der NO-Aktivierung durch die Anwesenheit der NOsGC-Stimulatoren.

	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]			x-fache Stimulation			Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]		
	basal	DEA/NO	BAY 41-8543 + DEA/NO	basal	DEA/NO	DEA/NO	basal	DEA/NO	DEA/NO
α_1 S / β_1	252,4 ± 73,8	8446,4 ± 2042,6	16557,9 ± 2867,6	33,5	65,6	2,0	100	100	100
α_1 S / β_1 W22F	199,9 ± 126,7	2443,7 ± 270,1	7902,7 ± 40,5	12,2	39,5	3,2	79,2 ± 50,2	28,9 ± 3,2	47,7 ± 0,2
α_1 S W669A / β_1	413,0 ± 138,2	6484,5 ± 955,1	14934,3 ± 394,6	15,7	36,2	2,3	163,6 ± 54,8	76,8 ± 11,3	90,2 ± 2,4
α_1 S W352F / β_1	67,3 ± 37,0	1830,2 ± 407,3	5438,4 ± 7,3	27,2	80,8	3,0	26,7 ± 14,6	21,7 ± 4,8	32,8 ± 0,04
α_1 S / β_1 W602F	253,3 ± 174,2	3037,7 ± 475,6	10792,4 ± 627,4	12,0	42,6	3,6	100,3 ± 69,0	36,0 ± 5,6	65,2 ± 3,8
α_1 S W466F / β_1	50,6 ± 8,9	1054,6 ± 267,5	8876,2 ± 1149,4	20,8	175,3	8,4	20,1 ± 3,5	12,4 ± 3,2	53,6 ± 6,9
α_1 S W352F W669A / β_1 W22F W602F	203,2 ± 112,3	3461,0 ± 802,2	7132,8 ± 889,8	17,0	35,1	2,1	80,5 ± 44,5	42,7 ± 9,5	43,1 ± 5,4
α_1 S W352F W669A / β_1 W602F	275,5 ± 86,5	2691,1 ± 216,4	12250,2 ± 801,2	9,8	44,5	4,6	109,1 ± 34,3	31,9 ± 2,6	74,0 ± 7,8
α_1 S / β_1 H105A	1286,3 ± 512,7	1359,7 ± 509,3	2668,3 ± 294,5	1,1	2,1	2,0	509,5 ± 203,1	16,1 ± 6,0	16,1 ± 1,8

Tabelle 4: Vergleich der spezifischen Aktivität der Mutanten mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur die Werte für BAY 41-8543 dargestellt. Eine vollständige Tabelle befindet sich im Anhang (siehe 11.1). Teile der Messungen wurden von Inga Neidhardt durchgeführt.

Neben der Aktivierung durch DEA/NO wurde auch die Aktivierung durch CO von α_1 W466F / β_1 im Vergleich zum Wildtyp-Enzym untersucht (Abbildung 28). CO steigerte weder beim Wildtyp-Enzym noch bei der Mutante die cGMP-Produktion, obwohl in anderen Studien eine Aktivierung des Wildtyp-Enzyms beschrieben wurde (Kharitonov et al., 1995; Stone und Marletta, 1994). Die Kombination des NOsGC-Stimulators BAY 41-8543 mit CO hingegen führte zu einem Anstieg der BAY 41-8543 induzierten Aktivität um das 1,5-fache für das Wildtyp-Enzym und um das 1,7-fache für die α_1 W466F / β_1 Mutante (Tabelle 5). Die Fachstimulation der Dreifach- und der Vierfach-Mutante lag bei 1,3.

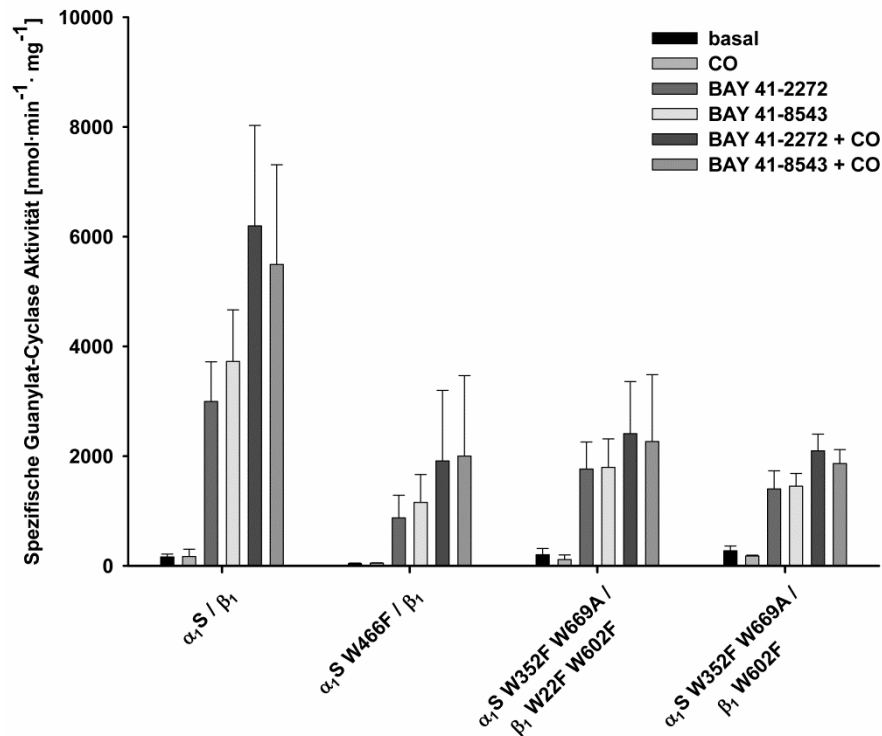


Abbildung 28: Einfluss der NOsGC-Stimulatoren auf die CO-stimulierte Aktivität

A Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität unter basalen Bedingungen, CO-Stimulation (10 μM), BAY 41-2272 (100 μM), BAY 41-8543 (100 μM), BAY 41-2272 + CO (je 100 μM) und BAY 41-8543 + CO (je 100 μM). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]			x-fache Stimulation			Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]		
	basal	CO	BAY 41-8543 + CO	basal	BAY 41-8543 + CO	BAY 41-8543 + CO	basal	CO	BAY 41-8543 + CO
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$	252,4 ± 73,8	171,4 ± 132,0	5493,0 ± 1816,8	0,7	21,8	1,5	100	100	100
$\alpha_1\text{S W466F} / \beta_1$	50,6 ± 8,9	49,7 ± 6,0	2001,2 ± 1465,7	1,0	39,5	1,7	20,1 ± 3,5	29,0 ± 3,5	36,4 ± 26,7
$\alpha_1\text{S W352F W669A} / \beta_1 \text{ W22F W602F}$	203,2 ± 112,3	113,2 ± 84,4	2265,6 ± 1218,6	0,6	11,1	1,3	80,5 ± 44,5	66,0 ± 49,3	41,2 ± 22,2
$\alpha_1\text{S W352F W669A} / \beta_1 \text{ W602F}$	275,5 ± 86,5	178,8 ± 16,4	1864,0 ± 253,8	0,6	6,8	1,3	109,1 ± 34,3	104,3 ± 9,6	33,9 ± 4,6

Tabelle 5: Spezifische CO und BAYS 41-8548 -stimulierte Aktivität ausgewählter Mutanten

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur die Werte für BAY 41-8543 dargestellt. Eine vollständige Tabelle befindet sich im Anhang (siehe 11.1).

4.2. Messung der Eigenfluoreszenz des an die NOsGC gebundenen 2'-Mant-3'-dGTP

Im Gegensatz zu den FRET-Messungen zwischen der Mant-Gruppe und den Tryptophanen der NOsGC, mit deren Hilfe sich eine Aussage über Konformationsänderungen der Domänen zueinander treffen lässt, geben die Messungen der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe Informationen über den Zustand der katalytischen Domäne und der Substratbindetasche. Zum Beispiel zeigten Mou et al., dass sich die Lipophilie der Substratbindetasche in der katalytischen Domäne der Adenylat-Cyclase durch den Aktivator Forskolin erhöht (Mou et al., 2005).

4.2.1. Fluoreszenz-Anstieg der Mant-Gruppe bei Bindung an die NOsGC

Zunächst wurde die Eigenfluoreszenz des Substratanalogons 2'-Mant-3'-dGTP bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Konzentration von 3 μ M bestimmt. Die daraus resultierende Fluoreszenz wurde als Vergleichswert für die folgenden Messungen verwendet. 2'-Mant-3'-dGTP fluoreszierte im Emissionsbereich von 380-500 nm mit einem Emissionsmaximum bei 445 nm (Abbildung 29A, blaue Kurve). Daher wurde bei allen folgenden Messungen jeweils die Emissionskurve von 380-500 nm bei einer Anregung mit 350 nm aufgenommen und zusätzlich eine Einpunktmessung mit einer Anregung von 350 nm und einer Emission bei 445 nm durchgeführt. Für die Messungen der Interaktion des 2'-Mant-3'-dGTPs mit der NOsGC (3 μ M) wurde diese zunächst als Negativkontrolle gemessen (Abbildung 29A, schwarze Kurve). Anschließend wurde 2'-Mant-3'-dGTP (3 μ M) zur NOsGC hinzu gegeben und erneut gemessen (Abbildung 29A, rote Kurve). Die Kurven zeigen, dass die Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe durch die Zugabe der NOsGC anstieg. Zuletzt wurde DEA/NO (100 μ M) zugegeben (Abbildung 29A, grüne Kurve), wodurch die Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe noch einmal deutlich anstieg. Beide Werte, basal und NO-stimuliert, wurden auf die reine Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe bezogen.

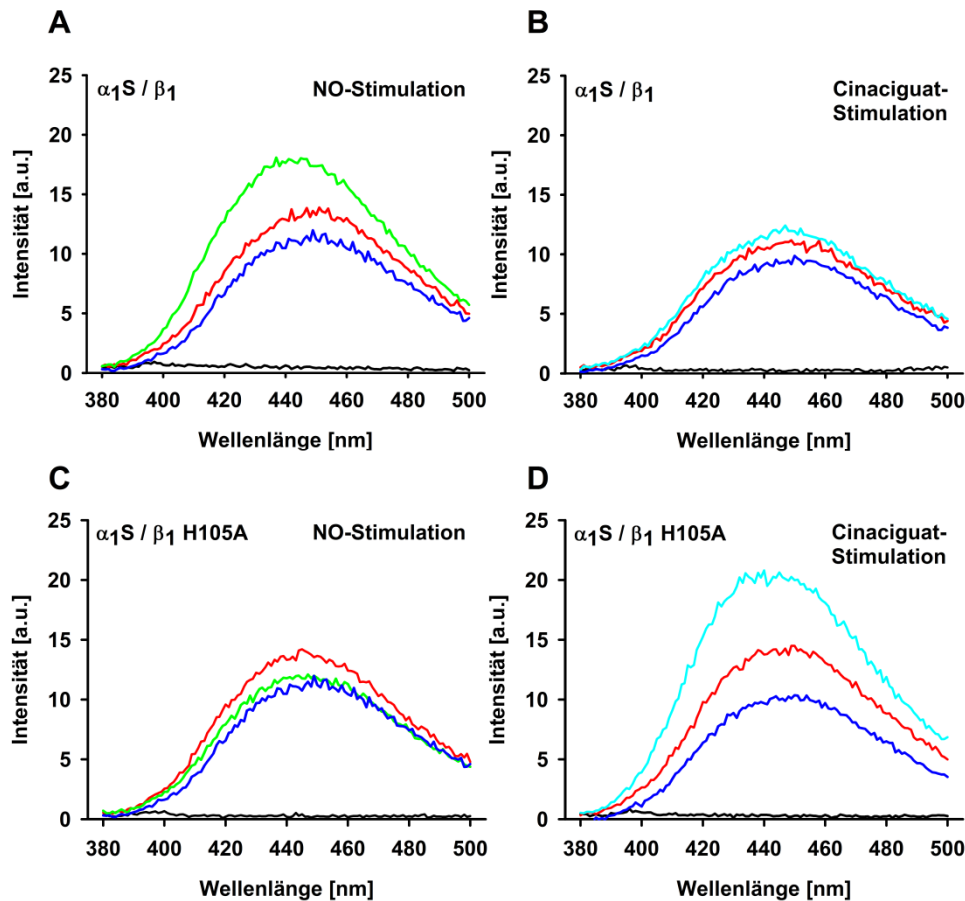


Abbildung 29: Kurven der direkten Fluoreszenz von 2'-Mant-3'-dGTP mit NOsGC

A und B α_1S / β_1 , C und D α_1S / β_1 H105A. In A und C ist die Stimulation der Enzyme durch NO dargestellt. In B und D ist die Stimulation der Enzyme durch Cinaciguat dargestellt. Eigenfluoreszenz der Enzyme (schwarze Kurven), Eigenfluoreszenz 2'-Mant-3'-dGTP (blaue Kurven), Enzyme mit 2'-Mant-3'-dGTP (rote Kurven), Enzyme mit 2'-Mant-3'-dGTP und DEA/NO (100 μ M) (grüne Kurven) und Enzyme mit 2'-Mant-3'-dGTP und Cinaciguat (10 μ M) (cyanfarbene Kurven). Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm in Anwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Messung aus drei Messungen.

Die Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe ist von den Eigenschaften ihrer Umgebung abhängig. Je hydrophober die Umgebung der Mant-Gruppe ist, desto stärker fluoresziert sie (Hiratsuka, 1983). Als Substratanalogon bindet 2'-Mant-3'-dGTP an die Substratbindungsstelle der NOsGC (Gille et al., 2004). Der Anstieg der Mant-Eigenfluoreszenz durch die Zugabe der NOsGC ($10,8 \pm 2,5$ %) belegt somit zum einen, dass das Substratanalogon an die Substratbindungsstelle gebunden hat und zum anderen, dass diese hydrophober ist, als das Lösungsmittel (Abbildung 30, schwarze Balken). Die zum Vergleich gemessene NO-insensitive Mutante α_1S / β_1 H105A führte zu einer höheren Mant-Eigenfluoreszenz ($22,4 \pm 5,6$ %) als das Wildtyp-Enzym und deutet damit auf eine erhöhte Lipophilie der Substratbindetasche bei dieser Mutante hin. Der Anstieg war jedoch nicht signifikant. In Enzymaktivitätsmessungen zeigt die Mutante α_1S / β_1 H105A ebenfalls einen gegenüber dem Wildtyp-Enzym erhöhten Basalwert (Abbildung 35), der den Eigenfluoreszenzmessungen zufolge

möglicherweise durch eine höhere Lipophilie der Substratbindetasche und / oder durch ein verbessertes Bindungsvermögen für GTP verursacht sein könnte.

Abbildung 30: Anstieg der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz des Wildtyp-Enzyms und der hämfreien NOsGC

Die 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz wurde in Anwesenheit des Wildtyp-Enzyms und der hämfreien NOsGC (basal), unter DEA/NO- und Cinaciguat-Stimulation gemessen und der prozentuale Anstieg gegenüber der 2'-Mant-3'-dGTP Eigenfluoreszenz berechnet. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm in Anwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt (siehe 0). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Messungen. * markiert einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Basalwert.

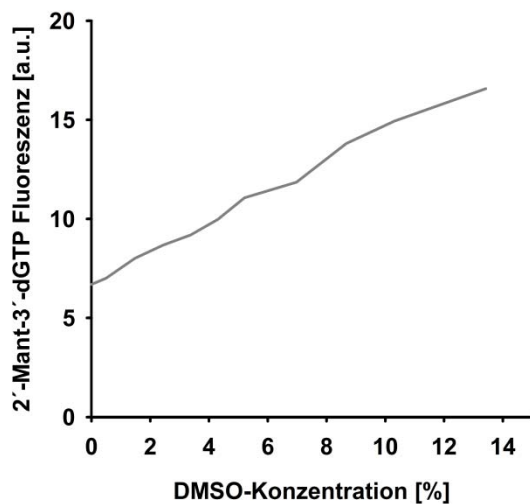
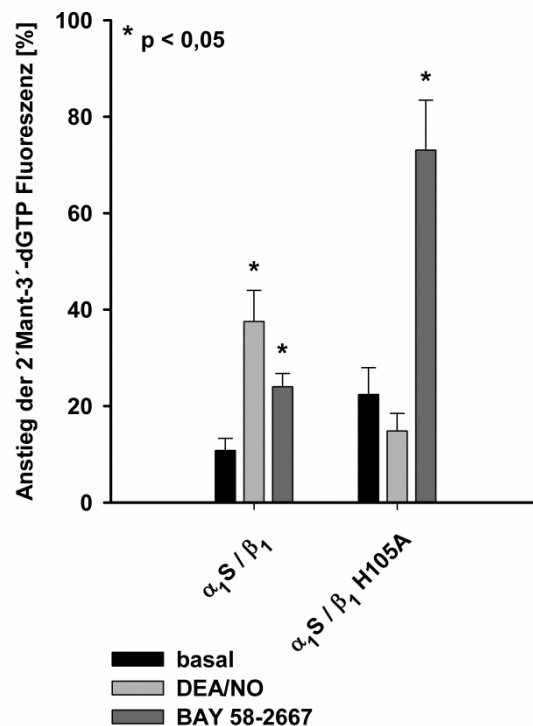


Abbildung 31: Abhängigkeit der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz von der Lipophilie des Lösungsmittels

Bei steigenden Konzentrationen des lipophilen Lösungsmittels DMSO steigt die Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe (3 μ M) kontinuierlich an.

Nach Zugabe von DEA/NO zur 2'-Mant-3'-dGTP gebundenen NOsGC kam es zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg der Mant-Eigenfluoreszenz um $37,5 \pm 6,5$ % (Abbildung 29A, grüne Kurve, Abbildung 30). Im Vergleich dazu zeigte die NO-insensitive Mutante α_1S / β_1 H105A keinen Anstieg durch NO-Stimulation, sodass dieser allein auf die Bindung von NO an die Guanylat-Cyclase zurückgeführt werden kann (Abbildung 29C, grüne Kurve, Abbildung 30). Der deutliche Anstieg der Eigenfluoreszenz beim Wildtyp-Enzym weist darauf hin, dass die NO-Stimulation eine starke Zunahme der Lipophilie innerhalb der Substratbindetasche verursacht. Möglicherweise kommt es

durch eine Konformationsänderung der katalytischen Domäne zu einem Schließen der Substratbindetasche, sodass sich weniger Wassermoleküle in der Bindetasche befinden. Eine weitere Erklärung könnte die Ausrichtung lipophiler Aminosäurereste in Richtung des Substrats und / oder eine effektivere Bindung von GTP an die Substratbindestelle sein.

Abbildung 31 zeigt das Fluoreszenz-Verhalten von freiem 2'-Mant-3'-dGTP bei steigenden DMSO Konzentrationen. Durch den Vergleich der Mant-Eigenfluoreszenz gebunden an die NOsGC mit der Mant-Eigenfluoreszenz bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen kann die Lipophilie der Bindetasche abgeschätzt werden. Die Intensität des an die NOsGC gebundenen 2'-Mant-3'-dGTPs (3 μ M) lag bei $10,9 \pm 1,3$ a.u. Diese entspricht der Lipophilie einer 5,4 % DMSO-Lösung. Die Mant-Eigenfluoreszenz in der NO-stimulierten NOsGC hingegen ($13,4 \pm 1,4$ a.u.) entsprach der Eigenfluoreszenz in einer 8,7 % DMSO-Lösung (Abbildung 31). Verglichen mit der Adenylat-Cyclase ist dies ein eher geringer Anstieg der Lipophilie, denn der Anstieg der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe entspricht bei der aktivierten Adenylat-Cyclase der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe in einer 30 % DMSO-Lösung (Göttle et al., 2007).

Neben dem Effekt von NO auf die katalytische Domäne wurden auch die Effekte des NOsGC-Aktivators Cinaciguat und des NOsGC-Stimulators BAY 41-8543 untersucht. Die NOsGC-Stimulatoren YC-1 und BAY 41-2272 konnten aufgrund ihrer hohen Eigenfluoreszenz, die sich mit der Mant-Fluoreszenz überlagerte, nicht gemessen werden. Cinaciguat verursachte beim Wildtyp-Enzym ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Mant-Eigenfluoreszenz ($24,0 \pm 2,7$ %). Dieser lag jedoch unterhalb des NO-induzierten Effekts (Abbildung 29B, cyane Kurve, Abbildung 30). Bei der NO-insensitiven Mutante α_1 S / β_1 H105A hingegen führt Cinaciguat zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg der Mant-Eigenfluoreszenz ($73,9 \pm 10,4$ %), der auch den NO-stimulierten Anstieg des Wildtyp-Enzyms überstieg ($37,5 \pm 6,5$ %) (Abbildung 29D, cyane Kurve, Abbildung 30). Dieses Verhältnis entspricht auch dem Verhältnis, das sich in Enzymaktivitätsmessungen ergibt (siehe Abbildung 35). Der stärkere Anstieg der Enzymaktivität durch Cinaciguat als durch NO wird demnach durch eine höhere Lipophilie in der aktivierten Substratbindetasche, durch das Ausrichtung lipophiler Aminosäurereste in Richtung des Substrats und / oder durch eine effektivere Bindung von GTP an die Substratbindestelle verursacht. Der NOsGC-Stimulator BAY 41-8543 führte beim Wildtyp-Enzym zu einem deutlichen, statistisch signifikanten Anstieg der Eigenfluoreszenz, wenn er zusammen mit DEA/NO eingesetzt wurde ($137,1 \pm 5,8$ %) (siehe Abbildung 34). Die Messungen zeigen, dass NO, Cinaciguat und BAY 41-8543 zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Verformung der Substratbindetasche in der katalytischen Domäne führen.

4.2.2. Vergleich der Fluoreszenz-Anstiege der Mant-Gruppe bei Bindung an die NOsGC-Mutanten

Neben dem Wildtyp-Enzym wurden auch die für die FRET-Messung erzeugten Mutanten hinsichtlich der Lipophilie ihrer Substratbindetasche untersucht. Unter basalen Bedingungen zeigte keine der Mutanten einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-Enzym. Allerdings unterlagen die Werte sehr hohen Schwankungen (Abbildung 32). Unter NO-Stimulation wiesen die Mutanten der Tryptophane 22, 352 und 669 keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-Enzym auf, ebenso wie die Dreifach- und die Vierfach-Mutante (Abbildung 33). Signifikante Abweichungen zeigten die Mutanten der Tryptophane 466 und 602. Der Anstieg der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz von α_1S / β_1 W602F war signifikant höher als der des Wildtyp-Enzyms, α_1S W466F / β_1 hingegen zeigte keinen Anstieg der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz und war somit signifikant niedriger als die Wildtyp-NOsGC. Das bedeutet, dass der Austausch des W466 vermutlich deshalb zu einer verminderten Enzymaktivität führt, weil es nicht zu einer Konformationsänderung der Substratbindetasche kommt (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 18). Die Zugabe von BAY 41-8543 in Kombination mit DEA/NO zur Mutante α_1S W466F / β_1 führte zu einem starken Anstieg der Mant-Eigenfluoreszenz (Abbildung 34). Dies weist darauf hin, dass NO in Gegenwart von BAY 41-8543 eine Verformung der Substratbindetasche auslöst. Der signifikant höhere Anstieg der Mutante α_1S / β_1 W602F weist darauf hin, dass es in dieser Mutante zu einem stärkeren Anstieg der Lipophilie unter NO-Stimulation kommt. Dieser führt jedoch nicht zu einer gesteigerten Aktivität (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 18).

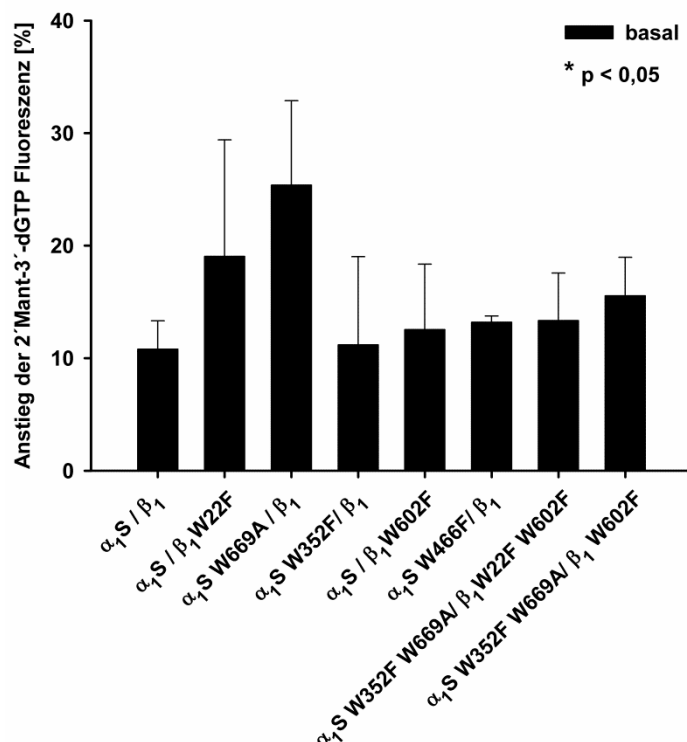


Abbildung 32: Messung der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz in Gegenwart der Enzym-Mutanten

Der Anstieg der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz durch die NOsGC und die Mutanten wurde zunächst unter basalen Bedingungen gemessen. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm in Anwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Keine der Mutanten zeigte einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-Enzym.

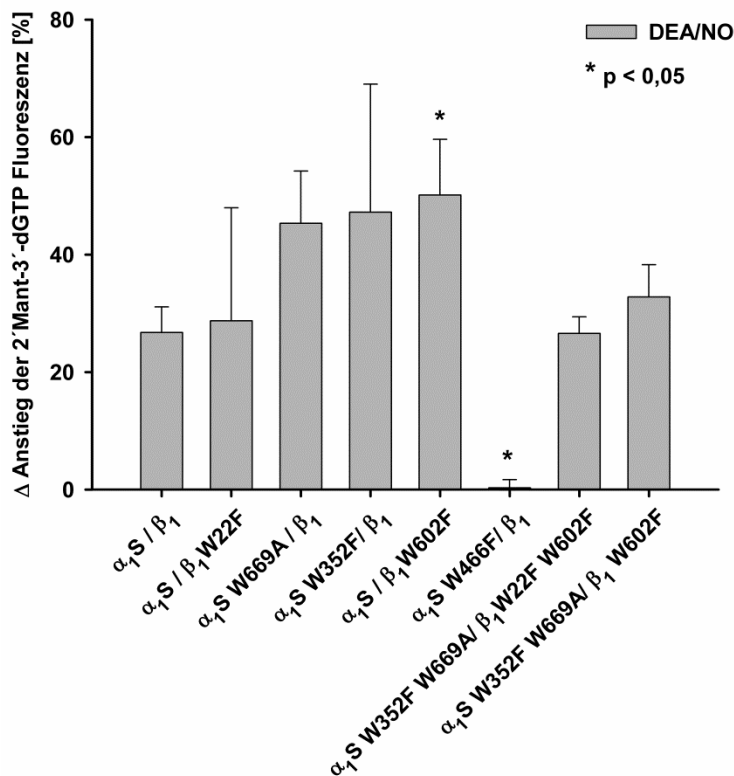


Abbildung 33: Anstieg der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz durch NO-Stimulation

Dargestellt ist die Differenz der 2'-Mant-3'-dGTP Eigenfluoreszenz in Anwesenheit des jeweiligen Enzyms von NO-stimulierten Bedingungen zu basalen Bedingungen. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm in Anwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. * markiert einen signifikanten Unterschied zum Wert des Wildtyp-Enzyms.

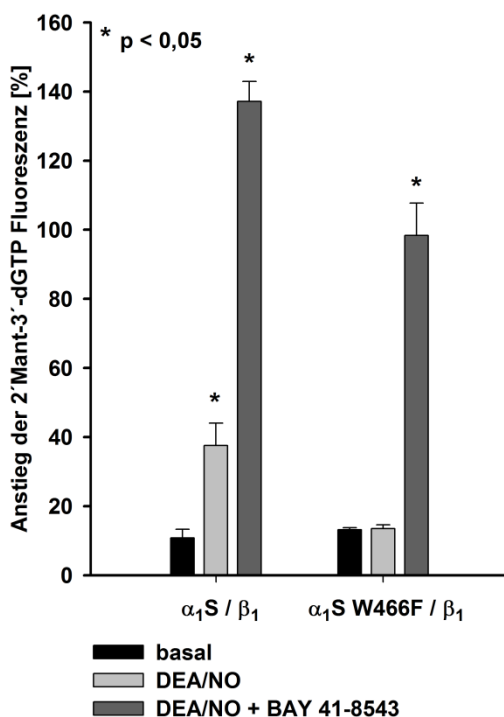


Abbildung 34: Einfluss von DEA/NO und BAY 41-8543 auf die NOsGC

Die 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz wurde in Anwesenheit der NOsGC (basal), unter DEA/NO- und Stimulation durch BAY 41-8543 (10 μM) gemessen und der prozentuale Anstieg gegenüber der 2'-Mant-3'-dGTP Eigenfluoreszenz berechnet. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm in Anwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt. * markiert einen signifikanten Unterschied zum Basalwert. Die Messungen der Mutante $\alpha_1S W466F / \beta_1$ wurden von Inga Neidhardt durchgeführt. Dargestellt sind Werte, die aus dreifacher Messung einer Anreinigung gewonnen wurden.

4.2.3. Verlust der Häm-Gruppe durch Mutation des W22 der β_1 -Untereinheit zu Alanin

Im Rahmen der für die FRET-Messungen durchgeführten Mutationen der Tryptophane wurde W22 der β_1 -Untereinheit auch zu Alanin ausgetauscht. Dieser Austausch zu Alanin führte zu einem durch NO und Cinaciguat signifikant verringert aktivierbaren Enzym (Abbildung 35). Aus den Absorptionsmessungen ergibt sich, dass die Mutante α_1S / β_1 W22A kein Häm enthält (Abbildung 36). α_1S / β_1 W22A wies im Vergleich zum Wildtyp-Enzym nur eine sehr geringe Absorption bei den für die Häm-Gruppe spezifischen 430 nm auf. Nach NO-Stimulation zeigt das Wildtyp-Enzym die typische Verschiebung der Soret Bande von 430 nm zu 399 nm (Abbildung 36A). Bei der W22A-Mutante stieg die Absorption bei 399 nm nicht an (Abbildung 36B). Die Absorptionskurven dieser Mutante sind vergleichbar mit der der hämfreien H105A-Mutante (Abbildung 36C). Der Austausch des W22 hingegen zu Phenylalanin (α_1S / β_1 W22F), welches genau wie Tryptophan eine aromatische, raumfordernde Seitenkette aufweist, verändert die Bindung von Häm nicht (Abbildung 36D). Daher scheint W22 entweder direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Häm-Bindungseigenschaften der NOsGC zu haben. Um zu klären, ob dieser Verlust des Häms durch den NOsGC-Aktivator Cinaciguat ausgeglichen werden kann, wurden Dosis-Wirkungskurven der Mutante α_1S / β_1 W22A im Vergleich zur Mutante α_1S / β_1 H105A und dem Wildtyp-Enzym gemessen (Abbildung 37). Aus den Kurven ergibt sich, dass die maximale Aktivierbarkeit durch Cinaciguat für die Mutante α_1S / β_1 H105A am höchsten ist. Die Mutante α_1S / β_1 W22A hingegen ließ sich durch Cinaciguat erst bei sehr hohen Konzentrationen schwach aktivieren. Der EC_{50} -Wert des Wildtyp-Enzyms ($28,5 \pm 6,3$ nM) war signifikant niedriger als der EC_{50} -Wert der Mutante α_1S / β_1 H105A ($68,1 \pm 6,5$ nM). Für die Mutante α_1S / β_1 W22A konnte kein EC_{50} -Wert bestimmt werden.

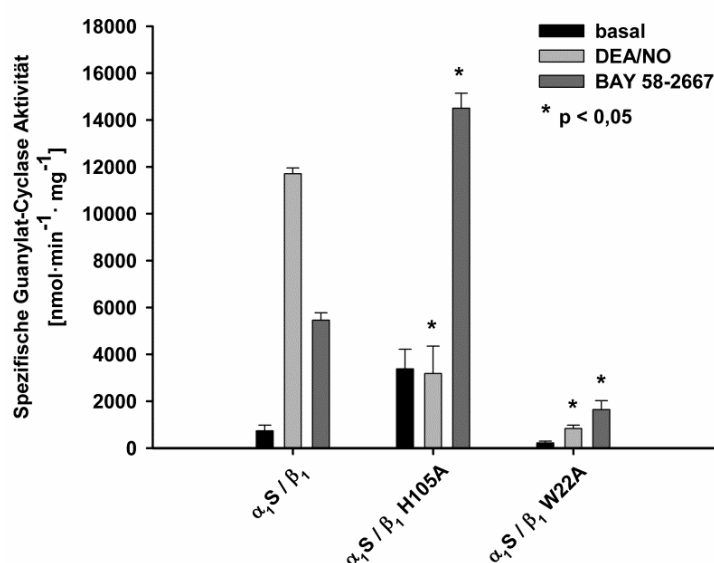


Abbildung 35: Vergleich der NO- und Cinaciguat-stimulierten Aktivitäten des Wildtyp-Enzyms, der β_1 H105A-Mutante und der β_1 W22A-Mutante

Der Austausch des W22 der β_1 -Untereinheit zu Alanin führt zu einem signifikanten Abfall der NO- und Cinaciguat-Aktivierbarkeit gegenüber dem Wildtyp-Enzym. Die hämfreie β_1 H105A-Mutante lässt sich hingegen durch Cinaciguat signifikant besser aktivieren als das Wildtyp-Enzym. * markiert die Signifikanz des Anstiegs gegenüber dem entsprechenden Wert des Wildtyp-Enzyms. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

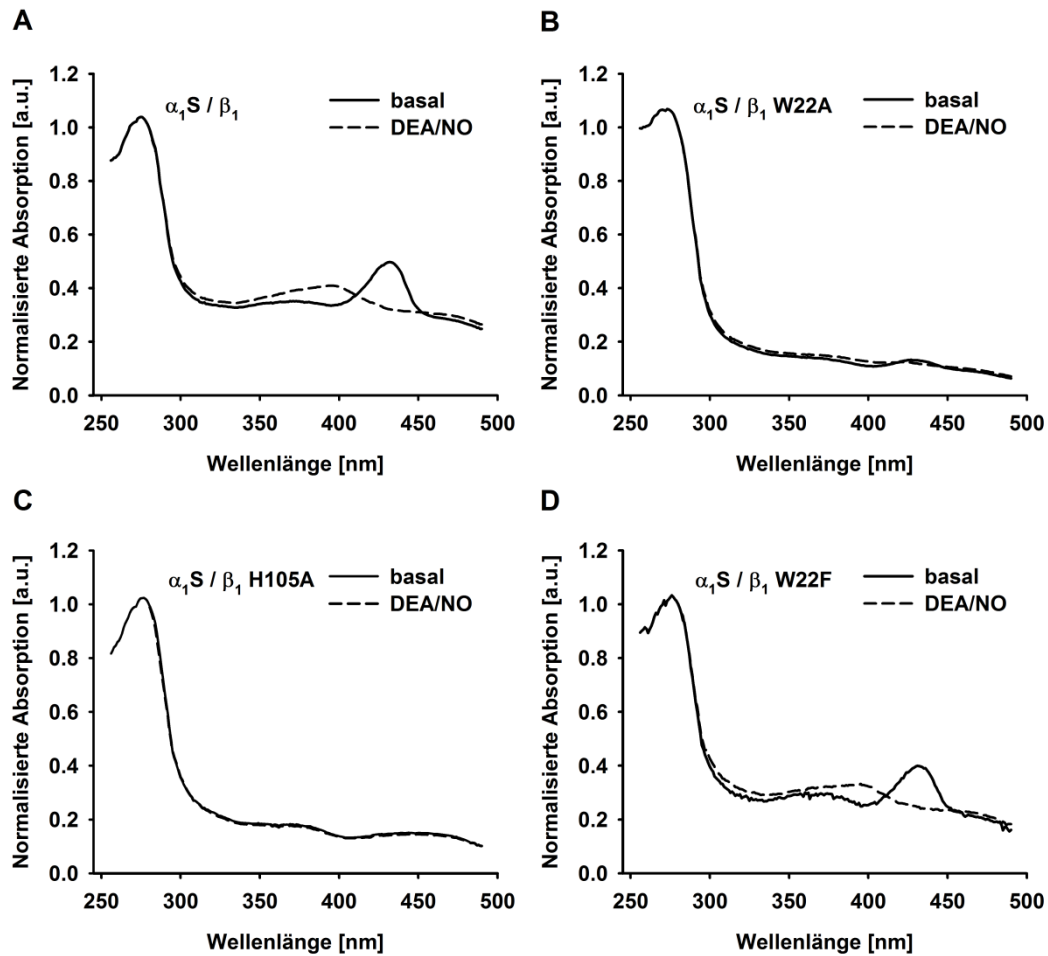


Abbildung 36: Absorption der W22-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym und der H105-Mutante

Die Mutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1 \text{W22A}$ zeigt wie die Mutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1 \text{H105A}$ keine Absorption im Bereich von 430 nm. Dies weist auf einen Verlust der Hämbindungseigenschaften der Mutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1 \text{W22A}$ hin. Dargestellt sind die auf 280 nm normalisierten Spektren einer repräsentativen Messung aus drei Messungen.

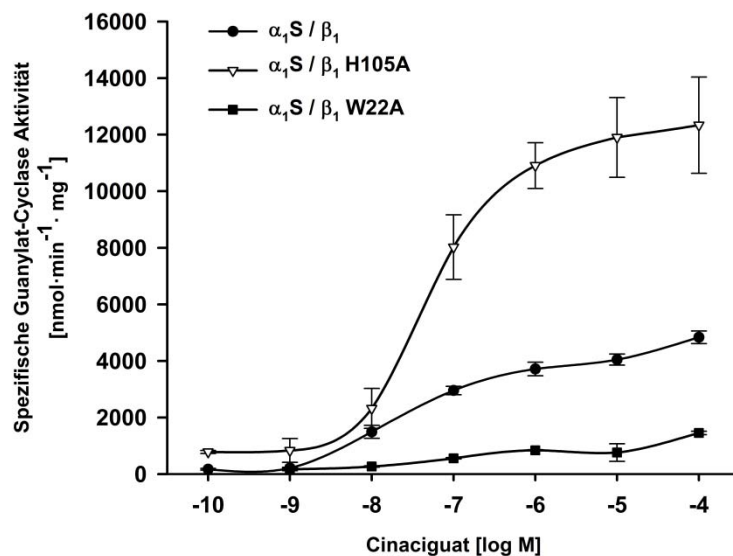


Abbildung 37: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven des Wildtyp-Enzyms, der $\beta_1 \text{H105A}$ -Mutante und der $\beta_1 \text{W22A}$ -Mutante für Cinaciguat

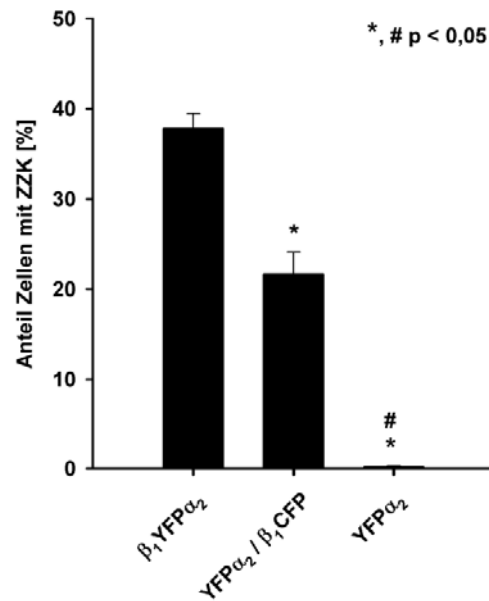
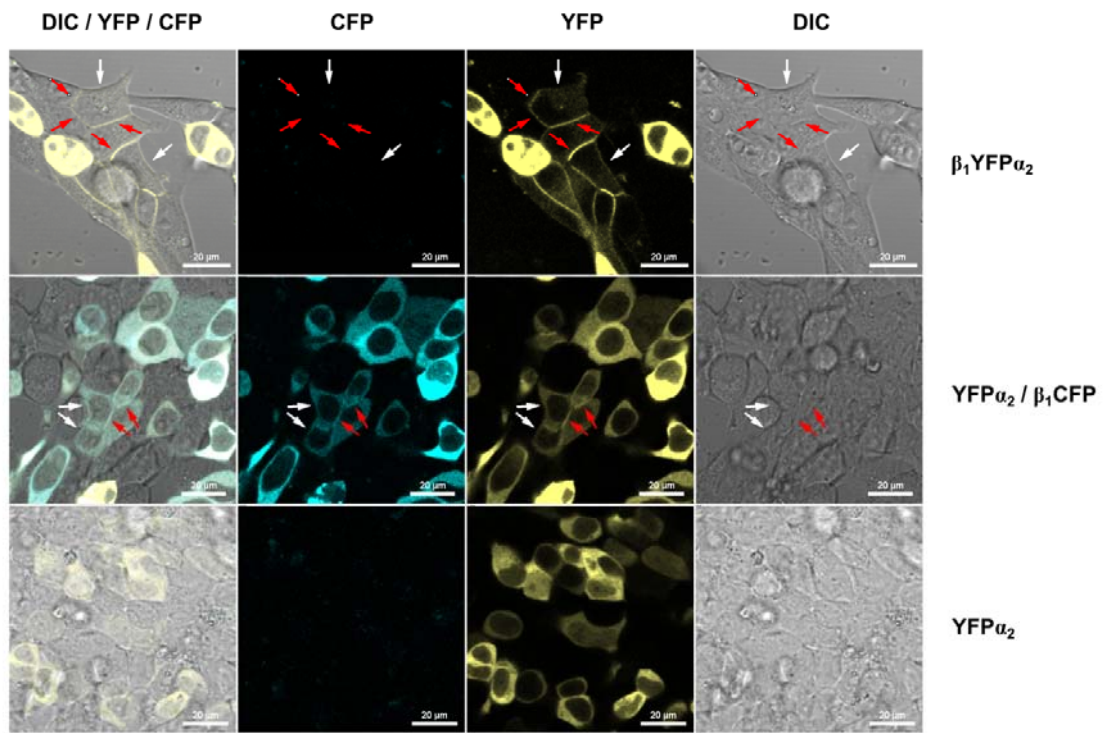
Die Mutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1 \text{W22A}$ ließ sich durch Cinaciguat erst bei sehr hohen Konzentrationen schwach aktivieren. Der EC_{50} -Wert konnte nicht bestimmt werden. Die maximale Aktivierbarkeit der Mutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1 \text{H105A}$ durch Cinaciguat war deutlich höher als die des Wildtyp-Enzyms. Der EC_{50} -Wert des Wildtyp-Enzyms ($28,5 \pm 6,3 \text{ nM}$) war signifikant niedriger als der EC_{50} -Wert der Mutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1 \text{H105A}$ ($68,1 \pm 6,5 \text{ nM}$). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

4.3. Subzelluläre Lokalisation der NOsGC Isoform α_2 / β_1

Neben den zuvor unter 4.1 und 4.2 beschriebenen Untersuchungen der Konformationsänderungen der NOsGC wurde in einem weiteren Teil die subzelluläre Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform untersucht. Haase zeigte, dass die α_2 / β_1 -Isoform nur dann an der Membran lokalisiert ist, wenn diese an eine Nachbarzelle grenzt und postulierte die Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten (Haase, 2010). Dies erweitert und bestätigt Befunde von Russwurm et al. und Bellingham und Evans, die eine Lokalisation der Isoform an der synaptischen Zellmembran über eine Interaktion mit PSD95 und an der apikalen Zellmembran von Epithelien beschrieben (Bellingham und Evans, 2007; Russwurm et al., 2001). In diesem Abschnitt der Arbeit soll untersucht werden, ob nur das Heterodimer an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, ob das Polaritätsprotein Scribble ein möglicher Interaktionspartner für diese Lokalisation ist und welche Funktion die Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten hat. Zusammen mit den gewonnen Daten über die Konformationsänderungen der NOsGC bilden die Ergebnisse zusätzlich eine Grundlage für die unter 4.4 beschriebene Entwicklung NOsGC-basierter Fluoreszenzsensoren.

4.3.1. Nur das Heterodimer liegt an Zell-Zell-Kontakten

Um die Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform zu untersuchen, wurde die mit dem Fluoreszenzprotein YFP fusionierte α_2 -Untereinheit der Ratte entweder alleine oder in Kombination mit der carboxy-terminal CFP markierten β_1 -Untereinheit in HEK293-Zellen exprimiert. Zum Vergleich wurde ein Fusionskonstrukt aus α_2 - und β_1 -Untereinheit in HEK293-Zellen exprimiert, bei dem die beiden Untereinheiten der NOsGC über ein YFP miteinander verbunden sind. Das Fusionskonstrukt $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ zeigte die von Haase beschriebene Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 38B). Die roten Pfeile markieren fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte, die weißen Pfeile zeigen die Ränder einer Zelle, an denen sich keine Nachbarzelle und somit auch keine fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte befinden. Um eine Quantifizierung der fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte vornehmen zu können wurde zunächst ein vollständig mit einem dichten Zellrasen bewachsener Ausschnitt gewählt. Dies garantiert, dass alle Zellen die gleiche Möglichkeit haben fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte zu ihren Nachbarzellen auszubilden. Anschließend wurden alle gelb fluoreszierenden Zellen gezählt, um diese Gesamtmenge der fluoreszierenden Zellen als Bezugsgröße nutzen zu können. Außerdem wurden alle Zellen gezählt, die mindestens einen fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakt aufwiesen. Dabei wurde bei einem Zell-Zell-Kontakt zwischen zwei fluoreszierenden Zellen nur eine Zelle gezählt. Zeigte dieselbe Zelle einen weiteren Zell-Zell-Kontakt zu einer anderen fluoreszierenden Nachbarzelle, wurde diese ebenfalls gezählt. Die so gezählten Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten wurden als Anteil aller fluoreszierenden Zellen quantifiziert (Abbildung 38A).

A**B****Abbildung 38: Häufigkeit von Zell-Zell-Kontakten**

A Anteil von Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten von allen fluoreszierenden Zellen in transient transfizierten HEK293-Zellen in Prozent. Nur das Fusionskonstrukt aus β_1 und α_2 -Untereinheit ($\beta_1\text{YFP}\alpha_2$) und das Heterodimer zeigen fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte. Die einzeln exprimierte α_2 -Untereinheit hingegen ist zytosolisch lokalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei ausgewerteten Bildern. * markiert signifikante Unterschiede gegenüber $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$. # markiert signifikante Unterschiede gegenüber $\text{YFP}\alpha_2 / \beta_1\text{CFP}$. **B** Konfokale Laser-Scanning mikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit dem Fusionsprotein, dem Heterodimer oder der α_2 -Untereinheit transient transfiziert wurden. Rote Pfeile markieren fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte, weiße Pfeile markieren Zellränder ohne direkte Nachbarzellen. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme.

Von den mit dem Fusionskonstrukt $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ transfizierten Zellen zeigten $37,8 \pm 1,7\%$ fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte. Da bei diesem Fusionskonstrukt die beiden Untereinheiten der NOsGC über das YFP miteinander verbunden sind, ist die Heterodimerisierung als Einflussfaktor auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten eliminiert. Diese Reduktion der Einflussfaktoren erleichtert zunächst die Bestimmung der Lokalisation der α_2/β_1 Isoform, impliziert jedoch, dass die Heterodimerisierung möglicherweise einen Einfluss auf die Lokalisation der NOsGC an Zell-Zell-Kontakten hat. Aus diesem Grund wurden auch die einzelnen fluoreszenzmarkierten Untereinheiten koexprimiert und auf die Sichtbarkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten untersucht und quantifiziert. Die α_2 -Untereinheit lag dabei amino-terminal mit YFP fusioniert vor, die β_1 -Untereinheit hingegen wurde carboxy-terminal mit CFP fusioniert. Abbildung 38 zeigt, dass auch das durch Koexpression gebildete Heterodimer eine Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten aufweist, insgesamt aber signifikant weniger Zellen diese Lokalisation zeigen ($21,7 \pm 2,4\%$) (Abbildung 38A). Die einzelne α_2 -Untereinheit hingegen zeigte keine Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 38A, B). Das Ausmaß der Heterodimerisierung spielt nach diesen Daten eine entscheidende Rolle für die Lokalisation der α_2 -Untereinheit an Zell-Zell-Kontakten. Dies liegt vermutlich an einer unterschiedlichen Faltung der monomeren α_2 -Untereinheit im Vergleich zur α_2 -Untereinheit im heterodimeren Enzym.

Haase konnte in seinen Versuchen zeigen, dass eine intakte carboxy-terminale RETSL-Sequenz der α_2 -Untereinheit für die Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten zwingend erforderlich ist (Haase, 2010). Bei der RETSL-Sequenz handelt es sich um die letzten fünf Aminosäuren der α_2 -Untereinheit, die für die Bindung an das PSD95 verantwortlich sind (Russwurm et al., 2001). Die Bindung erfolgt dabei über die PDZ-Domäne von PSD95, sodass die RETSL-Sequenz möglicherweise auch als Erkennungssequenz für interaktionsvermittelnde PDZ-Domänen weiterer Proteine dient.

Um aufzuklären, ob tatsächlich nur die RETSL-Sequenz oder ein längeres Peptidfragment für die Rekrutierung der α_2 -Untereinheit an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich ist, wurden zwei verschieden lange Carboxy-Termini der α_2 -Untereinheit kloniert und in HEK293-Zellen exprimiert. Das längere Fragment, $\text{YFP}\alpha_2$ 601-730 enthält die letzten 129 Aminosäuren, das kürzere, $\text{YFP}\alpha_2$ 680-730 enthält die letzten 50 Aminosäuren der α_2 -Untereinheit (siehe Abbildung 42). Da beiden Fragmenten die für eine Heterodimerisierung mit der β_1 -Untereinheit notwendigen Domänen fehlen, wurden sie einzeln in HEK293-Zellen exprimiert. Beide Fragmente zeigten im Gegensatz zur ungekürzten α_2 -Untereinheit eine signifikante Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 39). Die Häufigkeit der Zell-Zell-Kontakte des längeren Fragments lag unter dem Wert des Heterodimers, während die Häufigkeit der Zell-Zell-Kontakte des kürzeren Fragments den Wert des Heterodimers überstieg. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Das Ergebnis spricht dafür, dass bei der ungekürzten, monomeren α_2 -Untereinheit der Carboxy-Terminus durch die restliche Untereinheit abgeschirmt vorliegt, sodass die Bindung an eine PDZ-Domäne nicht erfolgen kann. Möglicherweise wird durch

das amino-terminale Verkürzen der α_2 -Untereinheit die RETSL-Sequenz zugänglich und bindet an ein Protein, das an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist.

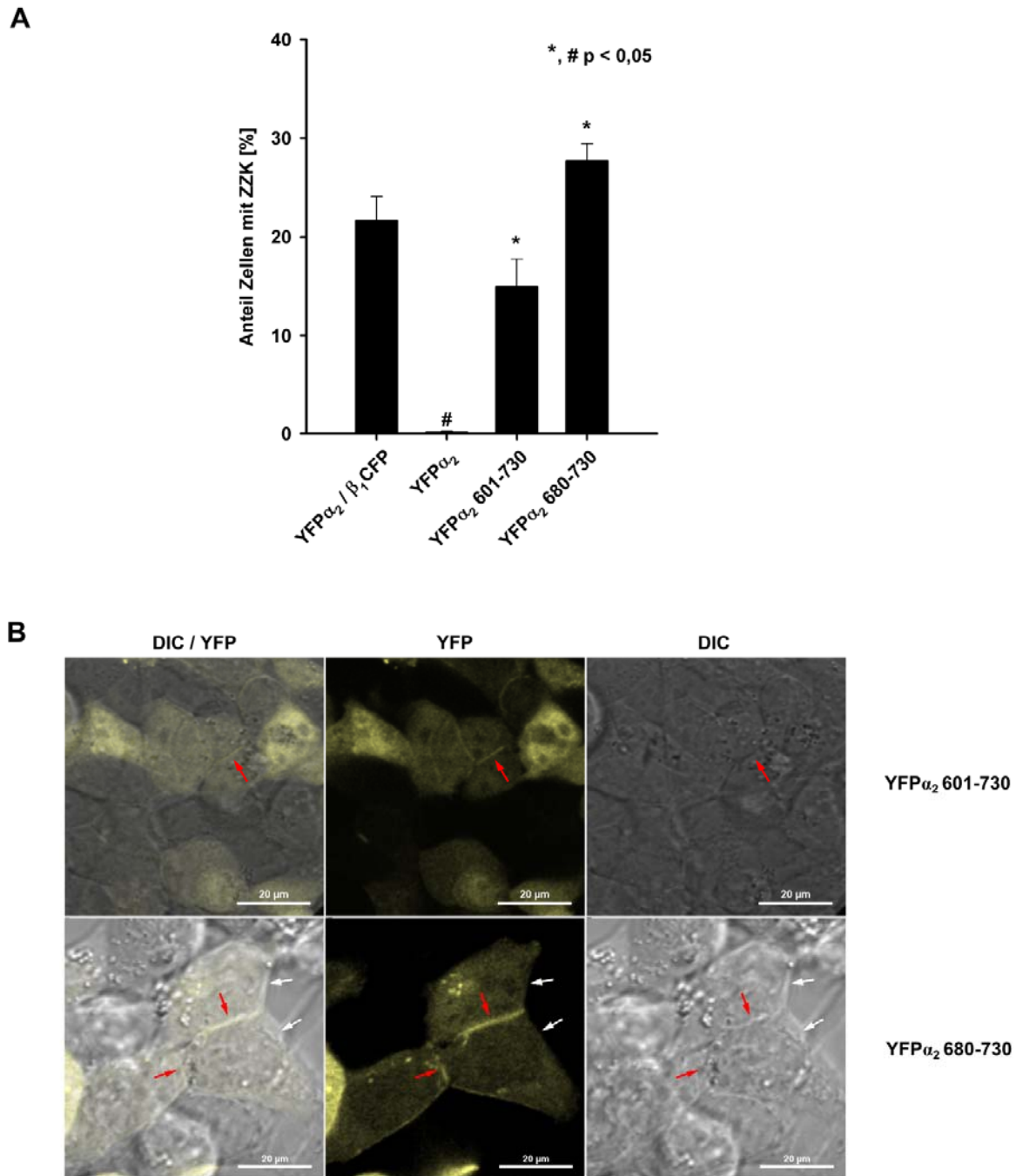


Abbildung 39: Häufigkeit von Zell-Zell-Kontakten der verkürzten α_2 -Untereinheit

A Prozentualer Anteil an Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten bezogen auf alle fluoreszierenden Zellen in transient transfizierten HEK293-Zellen. Die einzelne, unverkürzte α_2 -Untereinheit zeigt im Gegensatz zum Heterodimer und den verkürzten α_2 -Untereinheiten keine Zell-Zell-Kontakt Lokalisation. * markiert signifikante Unterschiede gegenüber YFP α_2 . # markiert signifikante Unterschiede gegenüber YFP α_2 / β_1 CFP. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei ausgewerteten Aufnahmen. **B** Konfokale Laser-Scanning mikroskopische Aufnahmen von mit den verkürzten YFP α_2 -Varianten transient transfizierte HEK293-Zellen. Rote Pfeile markieren fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte, weiße Pfeile markieren Zellränder ohne direkte Nachbarzellen. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme

4.3.2. Phosphorylierung der α_2 -Untereinheit

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 50 μM 8-Br-cGMP stieg die Anzahl der fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte des Fusionsproteins und des Heterodimers signifikant an (Abbildung 40). Auch bei einer Langzeitperfusion der mit dem Fusionsprotein transfizierten HEK293-Zellen für 15 Stunden mit dem langwirksamen NO-Donor DETA/NO (100 μM) ließ sich ein Anstieg der Häufigkeit fluoreszierender Zell-Zell-Kontakte nachweisen (Abbildung 41). Durch die Zugabe von zellmembrangängigem 8-Br-cGMP und durch die Aktivierung des Fusionskonstrukts mit NO steigt der cGMP-Spiegel in den Zellen. Nach den gemessenen Daten ist dieser Anstieg des cGMP der Auslöser für den Anstieg der Häufigkeit der fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte. Dies weist auf eine mögliche dynamische Regulation der Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform hin.

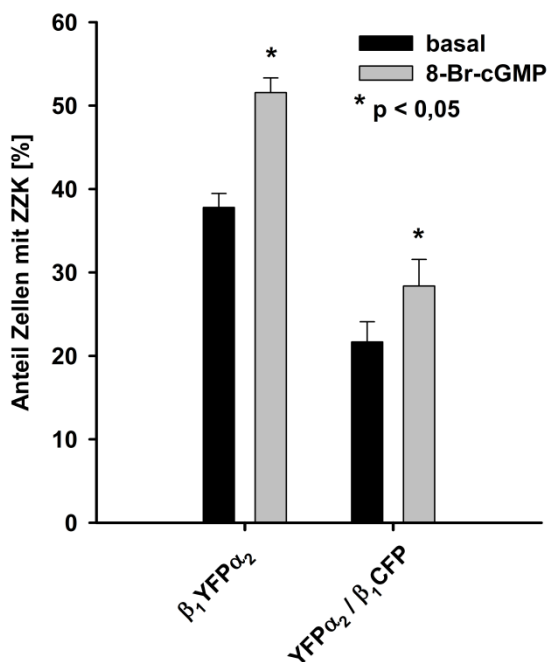


Abbildung 40: Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 50 μM 8-Br-cGMP stieg die Anzahl der fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte des Fusionskonstrukts und des Heterodimers signifikant an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen in denen jeweils mindestens drei Aufnahmen ausgewertet wurden.

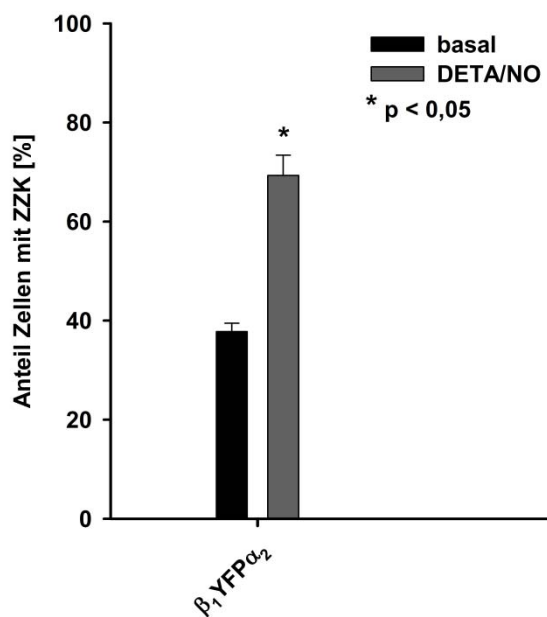


Abbildung 41: Einfluss von DETA/NO auf die Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten

Perfusion der mit dem Fusionkonstrukt transfizierten HEK293-Zellen mit dem langwirksamen NO-freisetzenden DETA/NO führte zu einem signifikanten Anstieg der Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten. Dargestellt ist der Mittelwerte aus einer Messung in der fünf Aufnahmen ausgewertet wurden.

Als zellgängiges cGMP Analogon führt 8-Br-cGMP wie cGMP selbst zur Aktivierung der PKG, besonders der PKG Ia (Lohmann und Walter, 2005; Pöhler et al., 1995). Die Erkennungssequenz der PKG ist R/K₂₋₃ - beliebig - S/T* (Kennelly und Krebs, 1991). Dieses Motiv findet sich in drei unterschiedlichen Domänen in der α_2 -Untereinheit: der amino-terminalen HNOX-Domäne, der coiled-coil Domäne und der katalytischen Domäne (Abbildung 42). An diesen drei Positionen könnte eine Phosphorylierung durch die PKG stattfinden, die für eine Regulation der Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grund wurde durch die Mutation des jeweiligen Serins (S) zu Glutaminsäure (E) eine Phosphomimese an zwei der potentiellen Erkennungssequenzen der PKG durchgeführt und die Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten überprüft (YFP α_2 S7E / β_1 CFP, YFP α_2 S717E / β_1 CFP). Dabei wurde die potentielle Phosphorylierungsstelle in der coiled-coil Domäne nicht berücksichtigt, da diese auch in der α_1 -Untereinheit zu finden ist und somit nicht spezifisch in der α_2 -Untereinheit vorkommt. Da 8-Br-cGMP zu einer Aktivierung der PKG und der damit verbundenen Phosphorylierung führt, sollte die Phosphomimese die Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten steigern. Die Serin-Mutante der Bindesequenz in der amino-terminalen Domäne von α_2 (YFP α_2 S7E / β_1 CFP) wies keine Veränderung des Anteils an Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten auf (Abbildung 43A). Die Mutation der potentiellen Phosphorylierungsstelle in der katalytischen Domäne (YFP α_2 S717E / β_1 CFP) führte entgegen den Erwartungen zu einer signifikant verringerten Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 43A).

		1		100
a1 (Homo sapiens)	(1)	-----MFCTKLKDLKIT-----GECFSSLAPGQVFN-----ESSEEAAGSSSECKATVPICQDIEKNIQESLP-----QRKTSRSRVYLHTL		
a2 (Homo sapiens)	(1)	--MSR[grün]TSS--ESFSSLSGSDYLETSP[grün]EEEGECPLSRLCWN[grün]GSRSP[grün]GPLEPSPAAAAA[grün]AAPTPAASAAAAA[grün]ATAGA-----RRVQRRRRVNLDSL		
a2 (Rattus norvegicus)	(1)	--MSR[grün]TSS--ESFSSLSGSDYLETSP[grün]EEEGECPLSRLCWN[grün]GSRSP[grün]GPPGSR--AAAMAATPVPAASVAAAAA[grün]VAAGS-----KRAQRRRRVNLDSL		
a2 (Bos taurus)	(1)	--MSR[grün]TSS--ESFSSLSGSDYLETSP[grün]EEEGECPLSRLCWN[grün]GSRAPGLPEPR--AAHVSARAPAAGAAAAA[grün]VSAATAGA-----RAQRRRRVNLDSL		
a2 (Mus musculus)	(1)	--MSR[grün]TSS--ESFSSLSGSDYLETSP[grün]EEEGECPLSRLCWN[grün]GSRSP[grün]GPPGSR--EAAKAATSAPAASAAAA[grün]SAVAEY-----KRAQRRGRVNLDSL		
a2 (Oryza latipes)	(1)	MSSS[grün]TSS--SGSFSSVSGSDCGLESP[grün]SGDGGGGGPELAENR[grün]GCFSSLPSSQRALLWNGRSSAERSACAAGEE[grün]QQQQQPP[grün]IPHKRVTRRRRVNLDSL		
		101		200
a1 (Homo sapiens)	(75)	AESICKLIFPEFERLNVALQRTLAKHKIK-----ESRKSLE[grün]R--EDFEKTIAEQAVAAGVPV[grün]EVIKESLGE[grün]EVFKICYEEDEN		
a2 (Homo sapiens)	(91)	GESISRLTAPSPQTIQQTLKRTLQY[grün]YEHQ--VIGYRDAEKNFHNISNRCSYADHSNKEIE[grün]DVSGILQCTANILGLKFEEIQKR[grün]GEEFFNICPFHENER		
a2 (Rattus norvegicus)	(89)	GESISLLTAPSPQTIHMTLKR[grün]TLQY[grün]YEHQ--VIGYRDAEKNFHNISNRCSADHSNKEIE[grün]DVSGILRCTANVLGLKFQEIQR[grün]FGEFFKICPDENER		
a2 (Bos taurus)	(90)	GESISRLTAPSPQMIQQTLKRTLQY[grün]YEHQ--VTGYRDEKFN[grün]YINISNRCSYADHSNKEIE[grün]EVSGILQCTANVLGLKFEEIQER[grün]FGEFFNICFPDNER		
a2 (Mus musculus)	(187)	GESISLLTAPLPQTIHMTLKR[grün]TLQY[grün]YEHQ--VIGYRDAEKNFHNISKRCSYADHSNKEIE[grün]DVSGILQCTANVLGLQFQEIQR[grün]FGEFFKICPDENER		
a2 (Oryza latipes)	(101)	GGSLKRLTSPTTQT[grün]VQ[grün]EALQRTLPYR[grün]KQ[grün]EIR[grün]CQ[grün]EVKSAERRR[grün]RETEEKCF[grün]LESSGSE--EDVLQILQYMATILGV[grün]PFC[grün]ELREH[grün]FGEEFFGLCFEENER		
		201		300
a1 (Homo sapiens)	(151)	ILGVVGGTLKDFLNSFSTLLKQSSH[grün]CQ[grün]EAGKGRLEDA[grün]SILCLDKEDD-----FLHVYFFPKRTTSLILPGIIKAAAHVLYETEVEVSL		
a2 (Homo sapiens)	(188)	VLRAVGGTLQDFN[grün]GFDALLEH--IRTSFGKQATLES[grün]PFLCKELPEG-----TLMLHYFHPHHIVGFAMLGMIKAAGKKIYRLDVEVEQ		
a2 (Rattus norvegicus)	(186)	VLRAVGGTLQDFN[grün]GFDALLEH--IRTSFGKQATLES[grün]PFLCKELPEG-----TLKLHYFHPHHTVGFAMLGMIKAAGKKIYHLNVEVEQ		
a2 (Bos taurus)	(187)	VLRAVGGTLQDFN[grün]GFDALLEH--IRTSFGKQATLES[grün]PFLCKELREG-----TLILHYFHPHHIVGFAMLGMIKAAGKKIYRLDVEV[grün]NQ		
a2 (Mus musculus)	(186)	VLRAVGGTLQDFN[grün]GFDALLEH--IRTSFGKQATLES[grün]PFLCKELPEG-----TLMLHYFHPHHTVGFAMLGMIKAAGKKIYHLNVEVEQ		
a2 (Oryza latipes)	(199)	VLRAVGGNLQDFN[grün]GFDALLEH--IRTSTGR[grün]RASSES[grün]PSPQCKDPR[grün]EEKGRKLDKGVN[grün]HGKVL[grün]LLHCFNPAPV[grün]VGLVMPGLIRAVARRIFHSEVEVEE		
		301		400
a1 (Homo sapiens)	(236)	MPP-----CFHNDCE[grün]FVN-----QPYLLYSVHMKSTKPSLS-----PSKPQSS[grün]LVIPTSLFCKTF		
a2 (Homo sapiens)	(271)	VAN-----EKLCSDVSNP[grün]GN-----CSCLTFLIKECENTNIMKNL-----PQ[grün]TSQV[grün]PADLRISINTFCRAF		
a2 (Rattus norvegicus)	(269)	IEN-----EKFCSDGSTPSN-----YSCLTFLIKECETTQITKNI-----PQ[grün]TSQIPTDLRISINTFCRAF		
a2 (Bos taurus)	(270)	VA-----EKLCSDG[grün]SNP[grün]GN-----CNGLAFLIRQ[grün]CENANI[grün]TKNI-----PQ[grün]TSQV[grün]PADLRISINTFCRAF		
a2 (Mus musculus)	(269)	IEN-----EKLCF[grün]DGSN[grün]PSN-----CSCLTFLIKECETTQITKDN-----PQ[grün]TSQV[grün]PADLRISINTFCRAF		
a2 (Oryza latipes)	(297)	VPPLTPLLPNEDTAHTGFDSTTPTTASPTASPS[grün]SSPSP[grün]SLFPTSIP[grün]TVCLSFQIQ[grün]VCPSSLSCPSS[grün]SSVSKRPP[grün]PSLSTNPSDLRIGLATFCRAF		
		401		500
a1 (Homo sapiens)	(287)	PFHFMFDKDMTILQFNGIRRLMNR[grün]RDFQ[grün]GKPNFEEYFEILTPKINQTFSGIMTMLNQFVVRVRRWDSVKKSSRVMDLKGQMIYIVESSAILFLGSPC		
a2 (Homo sapiens)	(328)	PFHLMFDPMSVLQ[grün]GEGLRKQLRCDTHK-VLKFD[grün]EDCFEIVSPKVNATF[grün]FVLLRLSTPFVIRTKPEASGSENKDKVMEVKGQMIHV[grün]PESNISILFLGSPC		
a2 (Rattus norvegicus)	(326)	PFHLMFDPNMVVLQ[grün]GEGLRKQLRCDNHK-VLKFD[grün]EDCFEIVSPKVNATF[grün]FVLLRLSTPFVIRTKPEASGTDNEDKVMIEKGM[grün]IHV[grün]PESNAILFLGSPC		
a2 (Bos taurus)	(326)	PFHLMFDPHMSVLQ[grün]GEGLRKQLRCDTHK-VLKFD[grün]EDCFEII[grün]SPKVNATF[grün]FVLLRLSTPFVIRTKPEASGTENKDKVMEVKGQMIHV[grün]PESNISILFLGSPC		
a2 (Mus musculus)	(326)	PFHLMFDSNMVVLQ[grün]GEGLRKQLRYDTHR-ALKFD[grün]EDCFEIVSPMINATF[grün]FVLLRLSTPFVIRTKPEASGTENEDKVMIEKGM[grün]IHV[grün]PESAILFLGSPC		
a2 (Oryza latipes)	(397)	PFHVLVLPHEMELLQ[grün]GEGLRQ[grün]RIE[grün]PHR-SFSFRD[grün]CFEIVSPKMEPSFQ[grün]GILLRLASPTI[grün]RTPDSTQAGTKEKVMELKGQMIHV[grün]PESCSLMFLGSPR		
		501		600
a1 (Homo sapiens)	(387)	VDRLEDFTGRGLYLSDIP[grün]IHNALRDVVLIGEQAQADGLKKR[grün]LGLKATLEQAHALEEE[grün]KKKTVDLLCSIFPCEVAQQLWQ[grün]GQVQAKF[grün]SNVTMLFSD		
a2 (Homo sapiens)	(427)	VDKLDEL[grün]MGRGLHLSDIP[grün]IHDA[grün]TRDVLVGEQAQADGLKKRMDK[grün]LKATLERTHQALEEE[grün]KKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQ[grün]GQVQAKF[grün]FDDVTMLFSD		
a2 (Rattus norvegicus)	(425)	VDKLDELIGRGLHLSDIP[grün]IHDA[grün]TRDVLVGEQAQADGLKKRMDK[grün]LKATLERTHQALEEE[grün]KKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQ[grün]GQVQAKF[grün]FDDVTMLFSD		
a2 (Bos taurus)	(425)	VDKLDEL[grün]MGRGLHLSDIP[grün]IHDA[grün]TRDVLVGEQAQADGLKKRMDK[grün]LKATLERTHQALEEE[grün]KKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQ[grün]GQVQAKF[grün]FDDVTMLFSD		
a2 (Mus musculus)	(425)	VDKLDEL[grün]MGRGLHLSDIP[grün]IHDA[grün]TRDVLVGEQAQADGLKKRMDK[grün]LKATLERTHQALEEE[grün]KKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQ[grün]GQVQAKF[grün]FDDVTMLFSD		
a2 (Oryza latipes)	(496)	VDKLEELMGRGLYLSDIP[grün]IHDA[grün]TRDVLVGEQAQADGLKKRMDK[grün]LKATLERTHQALEEE[grün]KKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQ[grün]GQVQAKF[grün]FDDVTMLFSD		
		601	V	700
a1 (Homo sapiens)	(487)	IVGFTAICSQCSP[grün]LQVITMLNALYTRFDQCGELDVYK[grün]VETIGDAYCVAGGLHKESDTHAVQIALMALKMMELSE[grün]DEVMSPHGEP[grün]IKMRI[grün]GLHSGSVFAGV		
a2 (Homo sapiens)	(527)	IVGFTAICAQCTPMQVISM[grün]LNELYTRFDHQCGFLDIYK[grün]VETIGDAYCVAAGLHRKSLCHAKPIALMALKMMELSE[grün]EVLTPDGRPIQMRI[grün]GIHSGSVLAGV		
a2 (Rattus norvegicus)	(525)	IVGFTAICAQCTPMQVISM[grün]LNELYTRFDHQCGFLDIYK[grün]VETIGDAYCVASGLHRKSLCHAKPIALMALKMMELSE[grün]EVLTPDGRPIQMRI[grün]GIHSGSVLAGV		
a2 (Bos taurus)	(525)	IVGFTAICAQCTPMQVISM[grün]LNELYTRFDHQCGFLDIYK[grün]VETIGDAYCVAAGLHRKSLCHAKPIALMALKMMELSE[grün]EVLTPDGRPIQMRI[grün]GIHSGSVLAGV		
a2 (Mus musculus)	(525)	IVGFTAICAQCTPMQVISM[grün]LNELYTRFDHQCGFLDIYK[grün]VETIGDAYCVASGLHRKSLCHAKPIALMALKMMELSE[grün]EVLTPDGRPIQMRI[grün]GIHSGSVLAGV		
a2 (Oryza latipes)	(596)	IVGFTAVCAHCTPMQVISM[grün]LNELYTRFDYQCGILDVYK[grün]IETIGDAYCVAGGLHKVD[grün]SHAKPIAHMALKMMELSE[grün]EVLTPDGKPIKLRIGIHTG[grün]SVLAGV		
		701	L	800
a1 (Homo sapiens)	(587)	GVGKMPRYCLFGNNVT[grün]LANKFESGSHPRRINVSPTTYQLLKRED[grün]SFTFIPRSREELPDNFPKEIPGICYFLE[grün]VRTGPKPKPKPSLSS----KDVEDGN		
a2 (Homo sapiens)	(627)	GVGKMPRYCLFGNNVT[grün]LANKFESGSHPRRINVSPTTYQLLKRED[grün]SFTFIPRSREELPDNFPKEIPGICYFLE[grün]VRTGPKPKPKPSLSS----SRI[grün]K[grün]VSYNI		
a2 (Rattus norvegicus)	(625)	GVGKMPRYCLFGNNVT[grün]LANKFESGSHPRRINVSPTTYQLLKRED[grün]SFTFIPRSREELPDNFPKEIPGICYFLE[grün]RLTGRPKPKPKPSLSS----SRI[grün]K[grün]VSYNI		
a2 (Bos taurus)	(625)	GVGKMPRYCLFGNNVT[grün]LANKFESGSHPRRINVSPTTYQLLKRED[grün]SFTFIPRSREELPDNFPKEIPGICYFLE[grün]VRTGPKPKPKPSLSS----SKL[grün]K[grün]VSYNI		
a2 (Mus musculus)	(625)	GVGKMPRYCLFGNNVT[grün]LANKFESGSHPRRINVSPTTYQLLKRED[grün]SFTFIPRSREELPDNFPKEIPGICYFLE[grün]RLTGRPKPKPKPSLSS----SRI[grün]K[grün]VSYNI		
a2 (Oryza latipes)	(696)	GVGKMPRYCLFGNNVT[grün]LANKFESGSHPRCINVSPTTYQLLKDDRSFSFVPRSRMDLPENFPKEIPGACYFLEAGTSHSHASLTSSRSAPPASMD[grün]K[grün]VSYNI		
		801	811	
a1 (Homo sapiens)	(680)	ANFLGKASGID		
a2 (Homo sapiens)	(723)	GTML[grün]RETS[grün]L-		
a2 (Rattus norvegicus)	(721)	GTML[grün]RETS[grün]L-		
a2 (Bos taurus)	(721)	GTML[grün]RETS[grün]L-		
a2 (Mus musculus)	(721)	GTML[grün]RETS[grün]L-		
a2 (Oryza latipes)	(796)	GTML[grün]RETS[grün]L-		

Abbildung 42: Sequenzvergleich verschiedener α_2 -Untereinheiten

In grün und grau sind potentielle Erkennungssequenzen für die PKG dargestellt, wobei die grau markierte Sequenz auch in der α_1 -Untereinheit vorkommt und daher nicht weiter untersucht wurde. In blau ist die potentielle Erkennungssequenz für die CaMKII markiert. Die rot markierten Aminosäuren markieren den Beginn der verkürzten α_2 -Untereinheiten YFP α_2 601-730 und YFP α_2 680-730. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW2 vorgenommen.

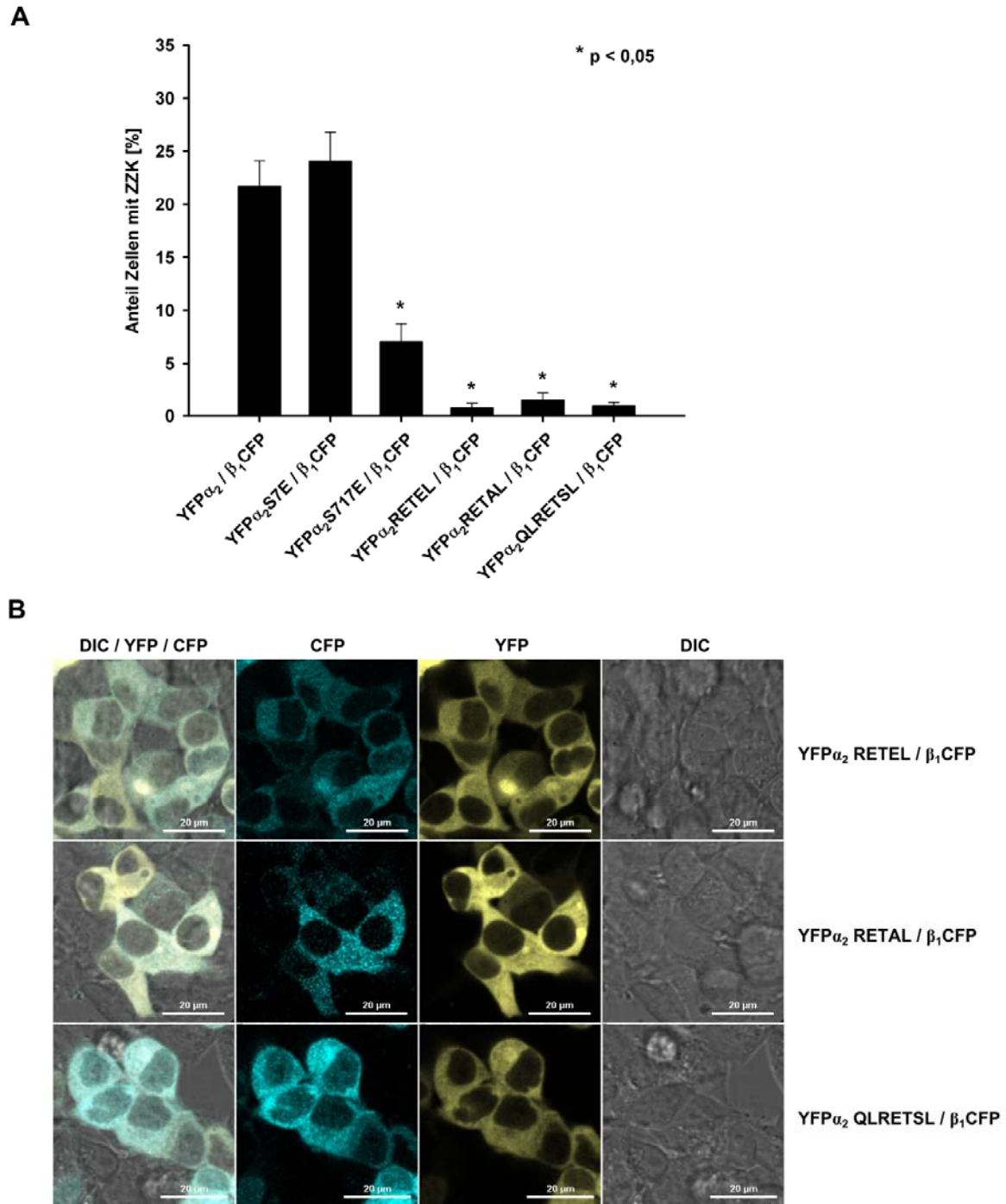


Abbildung 43: Häufigkeit von Zell-Zell-Kontakten der Erkennungssequenz-Mutanten

A Anteil an Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten von allen fluoreszierenden Zellen in transient transfizierten HEK293-Zellen in Prozent. Alle vier Mutationen in bzw. in der Nähe der RETSL-Sequenz (YFP α_2 S717, YFP α_2 RETEL, YFP α_2 RETAL, YFP α_2 QLRETSL) führen unabhängig von der Art der Mutation zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation. Die Mutante der potentiellen Erkennungssequenz der PKG im Amino-Terminus der α_2 -Untereinheit (S7E) hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des Heterodimers. * markiert signifikante Unterschiede gegenüber dem Wildtyp-Heterodimer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens einer Messung mit jeweils mindestens drei ausgewerteten Aufnahmen. **B** Konfokale Laser-Scanning mikroskopische Aufnahmen von mit Mutanten der Erkennungssequenz der CaMKII transient transfizierte HEK293-Zellen. Keine der drei Mutanten (YFP α_2 RETEL, YFP α_2 RETAL, YFP α_2 QLRETSL) zeigt eine Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten.

Ein weiterer möglicher Kandidat für eine dynamische Regulation der Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform könnte die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) sein. Die Erkennungssequenz dieser Serin / Threonin Kinase ist nach White et al.:

hydrophob-beliebig-R-beliebig-beliebig-S/T*

und entspricht damit den letzten sieben Aminosäuren der α_2 -Untereinheit FLRETSL (Abbildung 42 und Abbildung 44) (White et al., 1998).

Die CaMKII könnte über eine Phosphorylierung der α_2 -Untereinheit am Serin-Rest der RETSL-Sequenz die Interaktion mit einer PDZ-Domäne ermöglichen oder verhindern. Mit Hilfe von Mutationen dieses Serins an Position 729 (Ratte), sollte eine Beteiligung der CaMKII am Regulationsprozess der Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform untersucht werden. Dafür

wurde das Serin einerseits durch Glutaminsäure (E) ersetzt ($\text{YFP}\alpha_2\text{RETEL} / \beta_1\text{CFP}$), wodurch eine Phosphorylierung imitiert wird (Phosphomimese) (Barrientes et al., 2000; Maciejewski et al., 1995). Andererseits wurde das Serin zu Alanin (A) mutiert ($\text{YFP}\alpha_2\text{RETAL} / \beta_1\text{CFP}$), welches eine Phosphorylierung verhindern soll (Wada et al., 1996). Zu erwarten wäre, dass eine Mutation zu einem Anstieg der fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte führt, während die andere zu einer Abnahme der Zell-Zell-Kontakt-Häufigkeit führt. Abbildung 43 zeigt, dass beide Mutationen zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation führen.

Zusätzlich wurde das hydrophobe Phenylalanin (F) an Position 724 zum positiv geladenen Glutamin (Q) mutiert ($\text{YFP}\alpha_2\text{QLRETSL} / \beta_1\text{CFP}$). Dieses Phenylalanin sollte nicht an der Bindung an eine PDZ Domäne beteiligt sein (siehe 5.2), es liegt jedoch in der potentiellen Erkennungssequenz der CaMKII. Durch die Mutation würde diese zerstört, die CaMKII könnte nicht mehr binden und die Phosphorylierung des Serins fände nicht mehr statt. Die regulatorische Funktion der CaMKII auf die Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform wäre somit unterbunden. Bei einem Anstieg der Häufigkeit fluoreszierender Zell-Zell-Kontakte, wäre die nicht-phosphorylierte Form der NOsGC an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Bei einem Abfall der Häufigkeit fluoreszierender Zell-Zell-Kontakte, wäre die phosphorylierte Form der NOsGC an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Abbildung 43 zeigt, dass die Mutation der Erkennungssequenz ($\text{YFP}\alpha_2\text{QLRETSL}$) zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation führt.

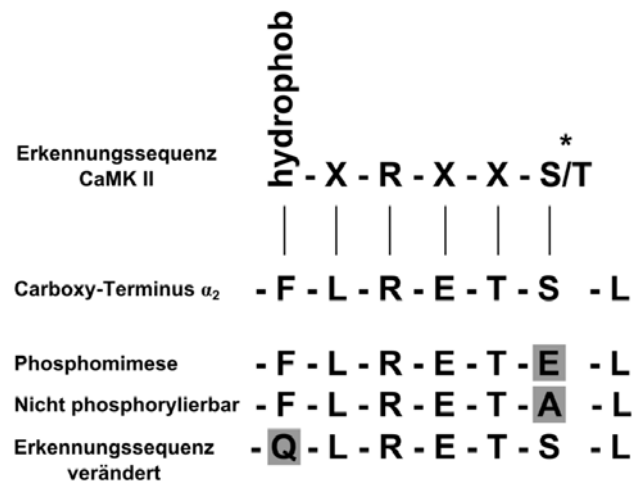


Abbildung 44: Erkennungssequenz der CaMKII in der α_2 -Untereinheit

Die grau markierten Aminosäuren wurden mutiert um eine Phosphomimese durchzuführen, eine mögliche Phosphorylierung zu verhindern oder um die Erkennungssequenz zu zerstören. * markiert die Aminosäure, die durch die CaMKII phosphoryliert wird.

4.3.3. Interaktion mit dem Polaritätsprotein Scribble

Scribble ist ein Regulator der apikalen-basolateralen Zellpolarität der zur Familie der LAP („leucine-rich repeats (LRR) and PDZ domains“) gehört (Bilder und Perrimon, 2000; Santoni et al., 2002). Er besteht aus 16 amino-terminalen Leucin reichen Regionen und vier PDZ Domänen, über die Scribble mit unterschiedlichsten Proteinen interagieren kann (zum Beispiel mit β -Catenin (Sun et al., 2009), MCC (Fukuyama et al., 2008), LPP (Petit et al., 2005)). Die LRR-Regionen und eine Interaktion mit dem an Zell-Zell-Kontakten befindlichen E-Cadherin sind für die Lokalisation von Scribble an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich (Navarro et al., 2005). Es gibt mehrere Hinweise in der Literatur, dass eine carboxy-terminale RETSL Sequenz an die PDZ Domänen von Scribble binden kann. So wurden zum Beispiel aus einem zufälligen Phagen-Pool Peptide auf die Bindung an die PDZ Domänen von Scribble untersucht. Dabei wurden mehrere Proteine mit einer RETSL-Sequenz als Bindungspartner für die dritte PDZ Bindedomäne von Scribble gefunden, von denen eines sogar den letzten sieben Aminosäuren der α_2 -Untereinheit entsprach: FLRETSL (Zhang et al., 2006).

Die α_2 -Untereinheit könnte daher über die Interaktion mit einer PDZ-Domäne von Scribble an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert sein. Aus diesem Grund wurde carboxy-terminal mit CFP markiertes humanes Scribble (Scrib-CFP) mit dem YFP-markierten Fusionskonstrukt aus β_1 und α_2 in HEK293-Zellen koexprimiert und eine mögliche Interaktion mit Hilfe von Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen (FLIM) zur Bestimmung eines FRET zwischen CFP und YFP untersucht. Dabei wurde die Fluoreszenz-Lebenszeit von alleine exprimiertem Scrib-CFP mit der Fluoreszenz-Lebenszeit von Scrib-CFP bei Koexpression mit β_1 YFP α_2 verglichen und die FRET-Effizienz berechnet. Abbildung 45 zeigt, dass es bei der Koexpression zu einer Abnahme der Fluoreszenz-Lebenszeit von CFP kommt und eine FRET-Effizienz von $4,5 \pm 0,9 \%$ erreicht wird. Auch bei Koexpression von Scrib-CFP und YFP α_2 mit nicht-markierter β_1 -Untereinheit ergibt sich eine Lebenszeit-Verkürzung und eine niedrigere FRET-Effizienz von $2,8 \pm 0,6 \%$. Die Werte waren nicht signifikant unterschiedlich, es wurden jedoch nur zwei Messungen für diese Koexpression durchgeführt. Das Auftreten von FRET weist auf eine Interaktion zwischen Scribble und der heterodimeren α_2 / β_1 -Isoform hin. Bei der Koexpression von Scrib-CFP mit der einzelnen YFP α_2 -Untereinheit hingegen konnte kein FRET detektiert werden. Um zu überprüfen, ob diese Interaktion über die RETSL-Sequenz vermittelt wird, wurde auch die Koexpression von Scrib-CFP mit der Mutante β_1 YFP α_2 RETSLR untersucht, die nach Versuchen von Haase nicht an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist (Haase, 2010). Die eingeführte positive Ladung des Arginins verhindert die Erkennung der Sequenz durch eine PDZ-Domäne. Die resultierende FRET-Effizienz zwischen Scrib-CFP und β_1 YFP α_2 RETSLR war signifikant niedriger als bei der Koexpression von Scrib-CFP mit β_1 YFP α_2 . Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Interaktion zwischen Scribble und der heterodimeren α_2 / β_1 -Isoform stattfindet, die über die carboxy-terminale PDZ-Bindesequenz RETSL der α_2 -Untereinheit vermittelt ist.

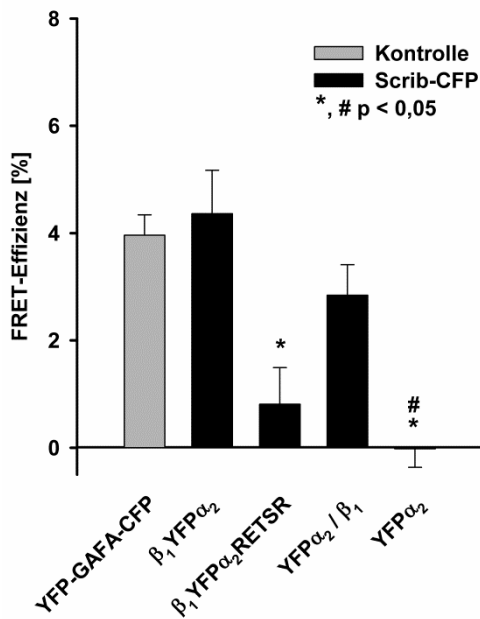


Abbildung 45: Interaktion zwischen Scribble und α_2 / β_1

FRET-Effizienz nach FRET-FLIM-Messung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens vier Messungen mit Ausnahme des Mittelwerts von YFP α_2 / β_1 , in den nur zwei Messungen eingeschlossen wurden. * markiert signifikante Unterschiede gegenüber β_1 YFP α_2 . # markiert signifikante Unterschiede gegenüber YFP α_2 / β_1 . Als Positivkontrolle wurde ein auf FRET-basierender cGMP-Sensor verwendet (YFP-GAFA-CFP), der aus der cGMP-bindenden Domäne der PDE5 (GAFA) und CFP und YFP besteht (Haase et al., 2010c; Nikolaev et al., 2006).

das endogen vorhandene Scribble beschränkt. Die Daten weisen jedoch nicht auf einen Anstieg der Häufigkeit an fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten bei der Koexpression von Scribble und dem Fusionskonstrukt hin (Abbildung 46C). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Interaktion der α_2 / β_1 -Isoform mit Scribble nicht für die Lage von α_2 / β_1 an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich ist.

Da Scribble an der basolateralen Membran und an Adhäsionsverbindungen zwischen Zellen lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion von α_2 / β_1 mit Scribble zur Rekrutierung an Zell-Zell-Kontakten führt (Nakagawa et al., 2004; Navarro et al., 2005). Falls Scribble für diese Rekrutierung verantwortlich ist, sollte die α_2 / β_1 -Isoform in einer Zelllinie, die wenig oder kein Scribble exprimiert, nicht an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert sein. Abbildung 46A zeigt einen Western Blot in dem das Zytosol von HEK293-Zellen im Vergleich zu dem Zytosol von PC12-Zellen auf die Expression von Scribble, α_2 und β_1 untersucht wurde. Dabei ergab sich, dass nur HEK293-Zellen, nicht jedoch PC12-Zellen Scribble nachweisbar exprimieren (Herstellerangaben zur Speziespezifität des Scribble Antikörpers: Mensch, Maus, Ratte). Abbildung 46B zeigt jedoch, dass das Fusionskonstrukt β_1 YFP α_2 auch in PC12-Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist. Wenn die Interaktion von α_2 / β_1 mit Scribble zu der Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten führt, würde vermutlich außerdem die Häufigkeit von Zell-Zell-Kontakten in mit Scribble und Fusionskonstrukt transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zur Einzelexpression des Fusionskonstrukts ansteigen. Die Rekrutierung wäre dann nicht nur auf

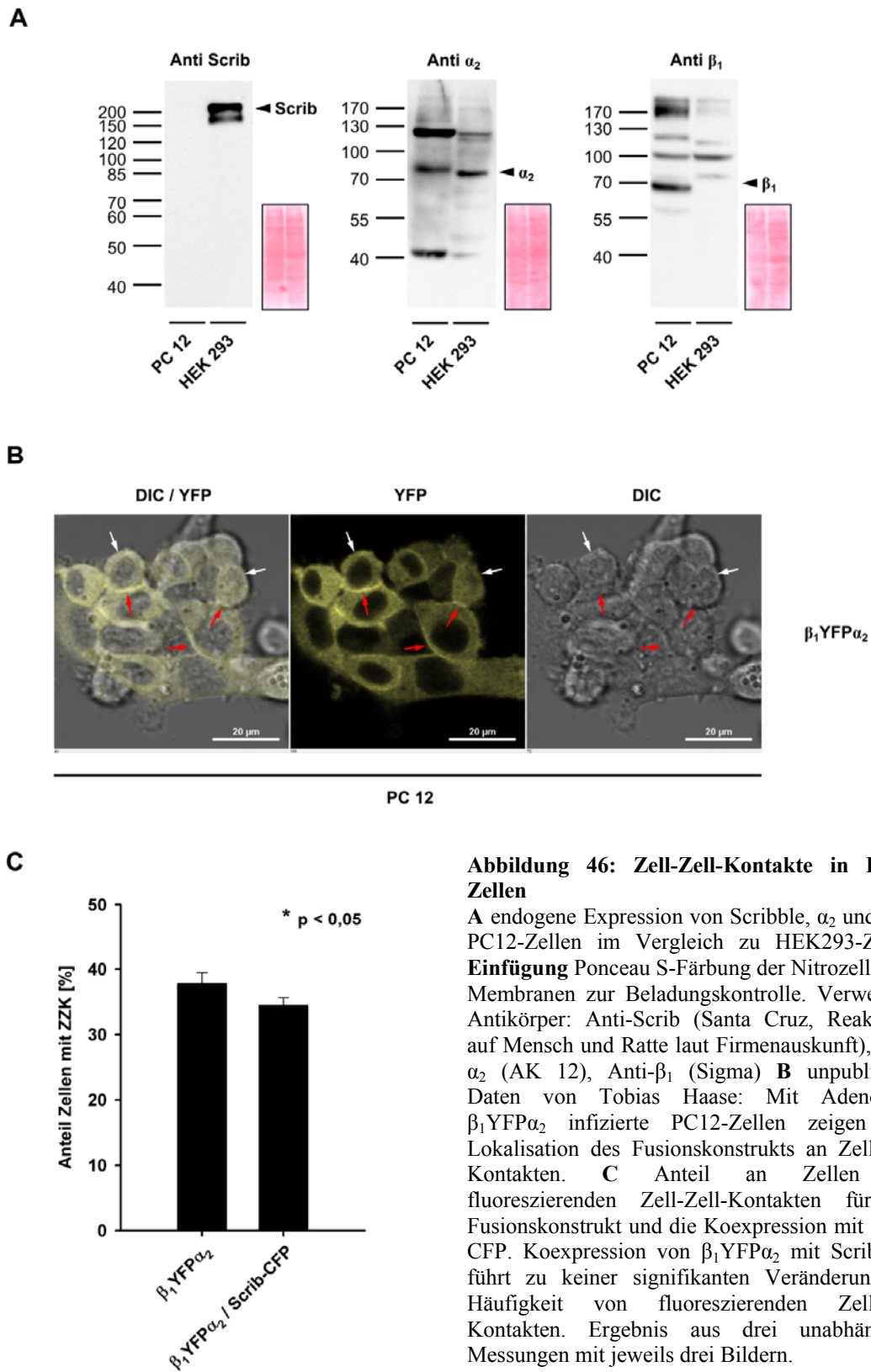


Abbildung 46: Zell-Zell-Kontakte in PC12-Zellen

A endogene Expression von Scribble, α_2 und β_1 in PC12-Zellen im Vergleich zu HEK293-Zellen. **Einfügung** Ponceau S-Färbung der Nitrozellulose-Membranen zur Beladungskontrolle. Verwendete Antikörper: Anti-Scrib (Santa Cruz, Reaktivität auf Mensch und Ratte laut Firmenauskunft), Anti- α_2 (AK 12), Anti- β_1 (Sigma) **B** unpublizierte Daten von Tobias Haase: Mit Adenovirus $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ infizierte PC12-Zellen zeigen eine Lokalisation des Fusionskonstrukts an Zell-Zell-Kontakten. **C** Anteil an Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten für das Fusionskonstrukt und die Koexpression mit Scrib-CFP. Koexpression von $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ mit Scrib-CFP führt zu keiner signifikanten Veränderung der Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten. Ergebnis aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei Bildern.

4.4. NOsGC als Fluoreszenzsensor

Mit Hilfe der Informationen zur Lokalisation der beiden NOsGC-Isoformen wurden auf Basis des cGMP-Fluoreszenzindikators FlnG („fluorescent indicator of cGMP“) zwei Fluoreszenzsensoren konstruiert und etabliert. Diese sollen für die Untersuchung der NO-abhängigen intrazellulären und lokalisationsbezogenen Aktivität der NOsGC eingesetzt werden. Der intensitätsbasierte cGMP-Sensor FlnG besteht aus dem regulatorischen Fragment der PKG I, welches mit einem cpEGFP („circular permuted enhanced green fluorescent protein“) fusioniert ist (Nausch et al., 2008). Dieses ist sensibel gegenüber Zug- und Spannungsänderungen auf seine Amino- und Carboxy-Termini und reagiert daher auf Konformationsänderungen eines fusionierten Proteins mit einem Anstieg seiner Fluoreszenzintensität (Abbildung 47A) (Baird et al., 1999; Nakai et al., 2001; Nausch et al., 2008; Tallini et al., 2006). In dem cGMP-Sensor FlnG verursacht die Bindung von cGMP an die regulatorische Domäne der PKG I eine umfangreiche Konformationsänderung, die zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität des cpEGFP führt (Nausch et al., 2008; Richie-Jannetta et al., 2006; Wall et al., 2003; Zhao et al., 1997). Für die neu entwickelten Konstrukte wurde ein FlnG verwendet, welches aus den Aminosäuren 1-333 des regulatorischen Fragments der PKG Ia (*bos taurus*) und cpEGFP besteht (siehe Abbildung 47A).

4.4.1. Aufbau

Die Grundidee für die Nutzung des cGMP-Sensors FlnG zur Entwicklung eines NO-Sensors basiert auf der direkten und lokalen Detektion des von der NOsGC produzierten cGMP. Um dieses Prinzip umzusetzen, wurden Fusionskonstrukte aus den beiden Untereinheiten der NOsGC und dem FlnG kloniert, um einerseits eine NO-abhängige katalytische Aktivität zu erreichen und andererseits das gebildete cGMP direkt zu detektieren. Die Grundlage für die Sensoren bildeten Arbeiten, in denen Fusionskonstrukte aus α_1 und β_1 -Untereinheit bzw. α_2 und β_1 -Untereinheit charakterisiert wurden (Haase et al., 2010a; Haase et al., 2010c). Für jede der beiden Isoformen der NOsGC, α_1 / β_1 und α_2 / β_1 , wurde unter Berücksichtigung der strukturellen Besonderheiten ein NO-Sensorkonstrukt entwickelt. Für die α_1 / β_1 -Isoform wurde das $\beta_1\alpha_1$ -Fusionskonstrukt verwendet, welches vollständig katalytisch aktiv ist (Haase et al., 2010a). FlnG wurde über eine kurze Verbindungssequenz carboxy-terminal an das $\beta_1\alpha_1$ -Fusionskonstrukt fusioniert (Abbildung 47B). Bei der α_2 / β_1 -Isoform sollte die carboxy-terminale RETSL-Sequenz der α_2 -Untereinheit (siehe 4.3.1) auch beim Fusionskonstrukt als carboxy-terminale Endsequenz bestehen bleiben, um die Lokalisation der Isoform an Zell-Zell-Kontakten zu erhalten. Daher wurde $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ von Haase et al. als Ausgangskonstrukt verwendet, welches wie das $\beta_1\alpha_1$ -Fusionskonstrukt eine vollständige katalytische Aktivität aufweist, und das YFP gegen das FlnG ausgetauscht (Abbildung 47C) (Haase et al., 2010c).

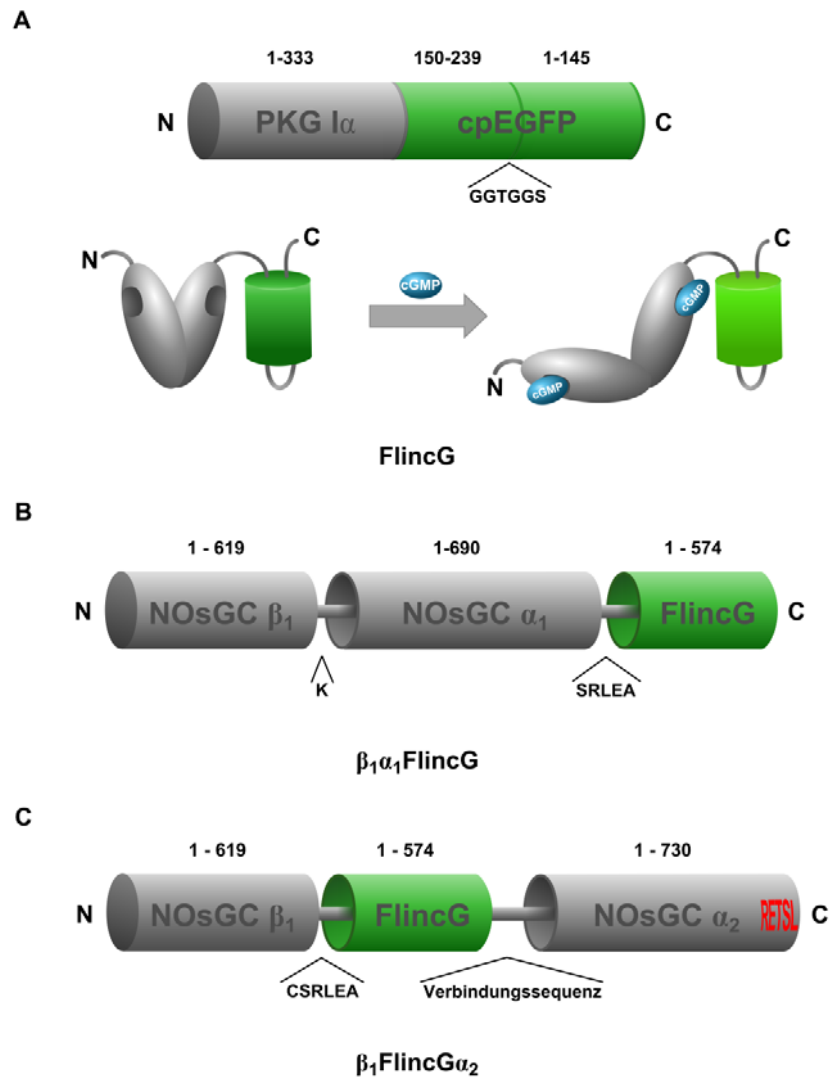


Abbildung 47: Aufbau der FlnG-Fusionskonstrukte

A FlnG besteht aus den ersten 333 Aminosäuren der PKG I α (*bos taurus*) und dem zug- und spannungssensitiven cpEGFP. Durch Bindung von cGMP an die amino-terminale Domäne der PKG I α kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einem Intensitätsanstieg des cpEGFP führt. **B** Aufbau des Fusionskonstrukts aus der α_1 / β_1 -Isoform der NOsGC mit FlnG. FlnG wurde carboxy-terminal an die α_1 -Untereinheit kloniert. **C** Aufbau des Fusionskonstrukts aus der α_2 / β_1 -Isoform der NOsGC mit FlnG. FlnG wurde zwischen die beiden Untereinheiten kloniert um die für die Lokalisation der Isoform notwendige carboxy-terminale RETSL-Sequenz zu erhalten. Sequenz der Verbindung: siehe Anhang (Kapitel 11).

4.4.2. Charakterisierung

Zunächst wurden die Konstrukte auf ihre Aktivität gegenüber NO untersucht. Dafür wurden die Konstrukte in HEK293-Zellen mit PEI transfiziert und nach 48 Stunden die Aktivität im Zytosol gemessen. Abbildung 48 und Abbildung 49 zeigen, dass beide Konstrukte basal aktiv sind und sich ihre Aktivität durch NO stimulieren lässt. Im Western Blot konnte die Richtigkeit der Konstrukte bestätigt werden: 1. über die richtige Laufhöhe (213 kDa für $\beta_1\alpha_1$ FlnG und 222 kDa für β_1 FlnG α_2)

2. über die Erkennung der Konstrukte durch die Antikörper gegen die α_1 -, α_2 -, β_1 -Untereinheiten und gegen GFP (Erkennung von FlnG).

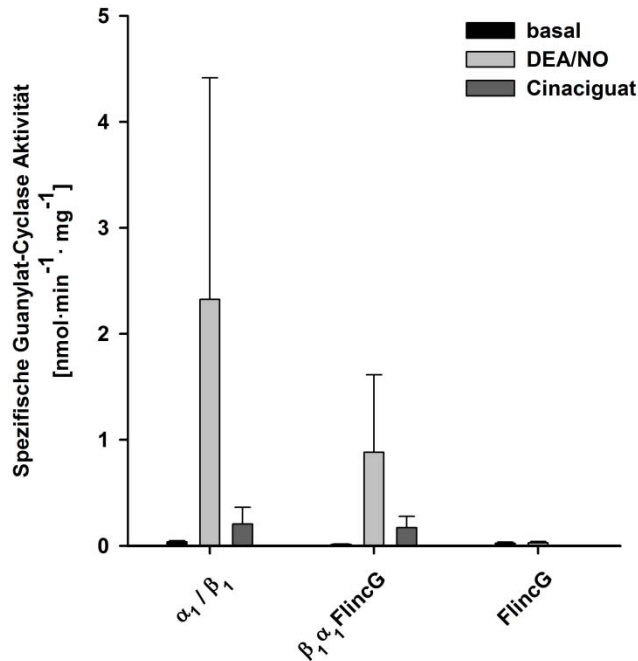


Abbildung 48: Vergleich der Aktivität von $\beta_1 \alpha_1$ FlnG mit dem Wildtyp-Enzym

Die spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität wurde unter basalen, NO-stimulierten und Cinaciguat-stimulierten Bedingungen gemessen. Die Aktivität von $\beta_1 \alpha_1$ FlnG wird wie die Aktivität des Wildtyp-Enzyms durch NO und Cinaciguat stimuliert. FlnG ist nicht durch NO stimulierbar. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen.

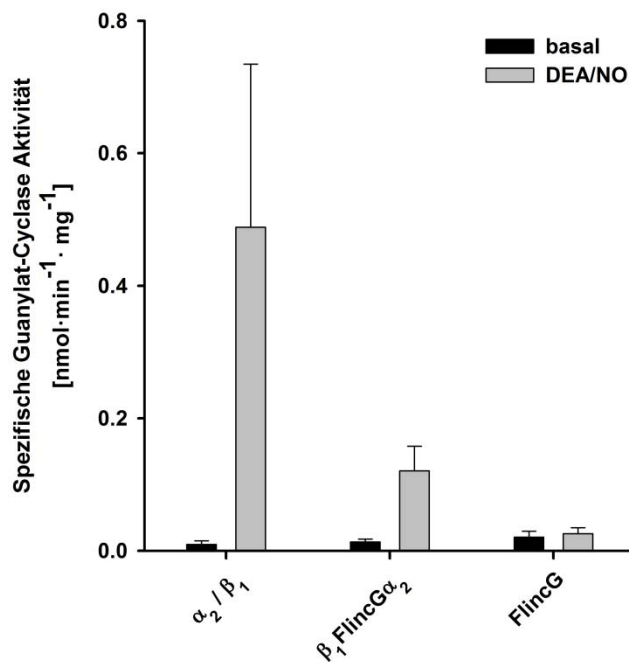


Abbildung 49: Vergleich der Aktivität von β_1 FlnG α_2 mit dem Wildtyp-Enzym

Die spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität wurde unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen gemessen. Die Aktivität von β_1 FlnG α_2 wird wie die Aktivität des Wildtyp-Enzyms durch NO stimuliert. Zum Vergleich wurde FlnG als Negativkontrolle gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen.

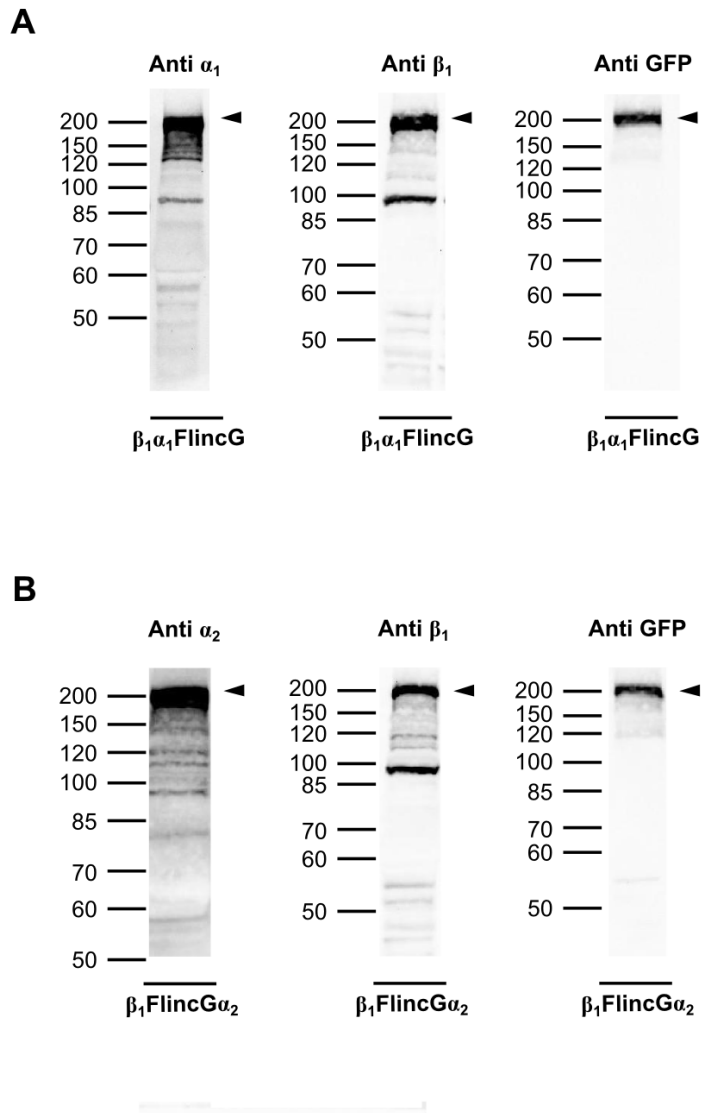


Abbildung 50: Western Blot der FlnG-Fusionskonstrukte

Die Konstrukte wurden in HEK293-Zellen exprimiert und die zytosolische Fraktion über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

A $\beta_1\alpha_1$ FlnG (213 kDa) wurde mit drei verschiedenen Antikörpern identifiziert: die α_1 -Untereinheit der NOsGC (Anti- α_1), die β_1 -Untereinheit der NOsGC (Anti- β_1) und das cpEGFP des FlnG (Anti-GFP).

B β_1 FlnG α_2 (222 kDa) wurde über die α_2 -Untereinheit der NOsGC (Anti- α_2 , EP073513), die β_1 -Untereinheit der NOsGC (Anti- β_1) und das cpEGFP des FlnG (Anti-GFP) identifiziert.

4.4.3. $\beta_1\alpha_1$ FlnG als Sensor für NO und Cinaciguat

Die Zellen wurden jeweils bei einer Flussrate von 100 μl / min mit dem zellmembrangängigen cGMP-Analogon 8-Br-cGMP oder dem langsam freisetzenden NO-Donor DETA/NO umspült (siehe 3.2.11.3). Zu Beginn der Messungen wurden die Zellen zunächst mit Medium ohne Wirkstoffe umspült. Dabei fiel auf, dass es beim Anschalten der Pumpe bei allen Konstrukten zu einem starken Fluoreszenzanstieg kam, der auf einem konstanten Niveau blieb, solange der Fluss konstant gehalten wurde (Abbildung 51). Von diesem konstanten Niveau aus wurden dann die Intensitätsänderungen der Konstrukte als Reaktion auf die Wirkstofflösungen untersucht.

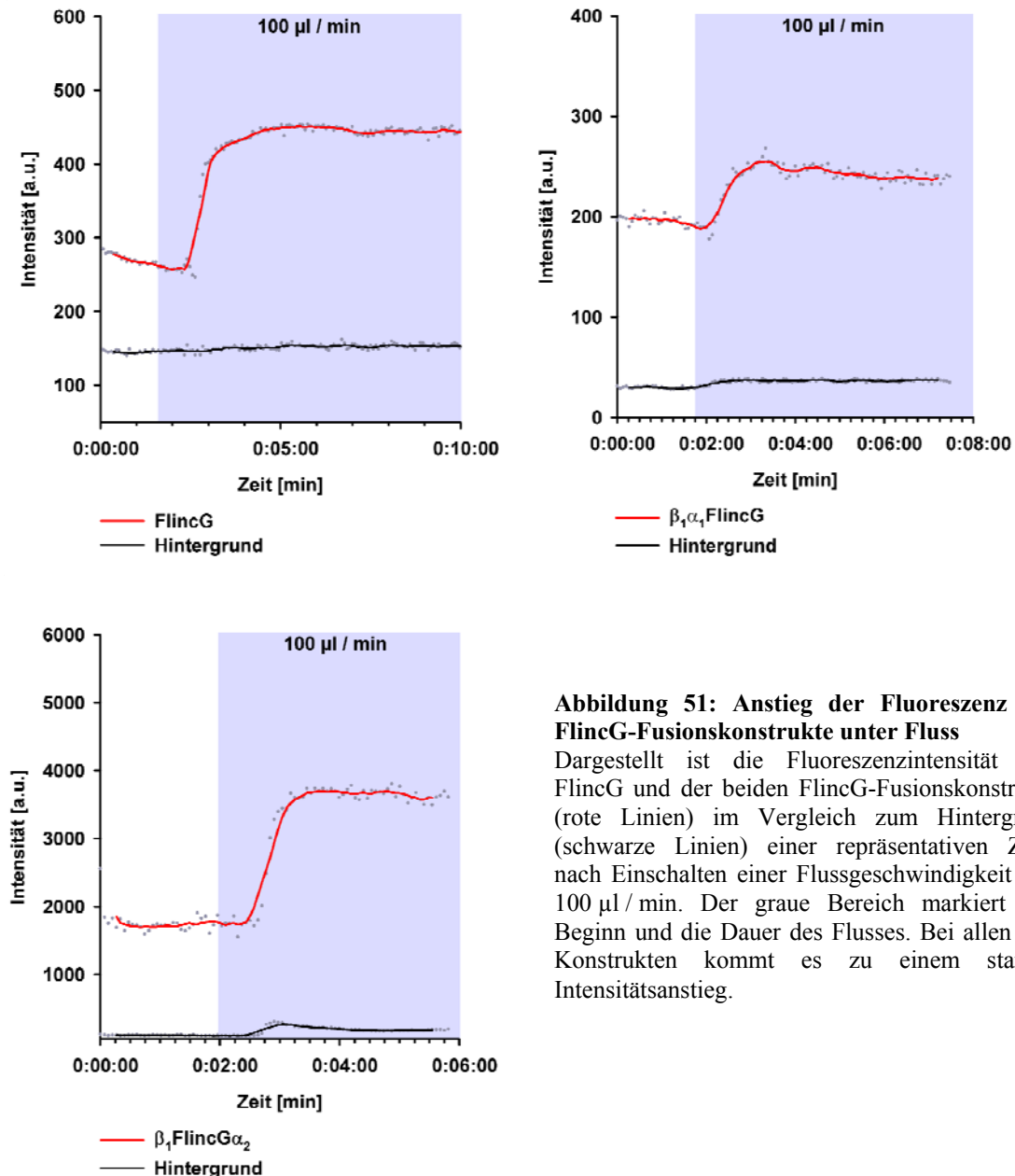


Abbildung 51: Anstieg der Fluoreszenz der FlnG-Fusionskonstrukte unter Fluss

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von FlnG und der beiden FlnG-Fusionskonstrukte (rote Linien) im Vergleich zum Hintergrund (schwarze Linien) einer repräsentativen Zelle nach Einschalten einer Flussgeschwindigkeit von 100 µl/min. Der graue Bereich markiert den Beginn und die Dauer des Flusses. Bei allen drei Konstrukten kommt es zu einem starken Intensitätsanstieg.

Zunächst wurde mit dem Ausgangskonstrukt FlnG und 8-Br-cGMP geprüft, ob mit dem Perifusionssystem Intensitätsänderungen des FlnG detektiert werden können. Dafür wurden die Messbereiche auf einzelne ganze fluoreszierende Zellen festgelegt. Abbildung 52A und Abbildung 53 zeigen, dass 8-Br-cGMP zu einem deutlichen Intensitätsanstieg des FlnG führt ($22,1 \pm 1,2 \%$) und das System demnach als Testsystem geeignet ist. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem NO-Donor DETA/NO umspült. FlnG zeigte keinen deutlichen Intensitätsanstieg, was darauf hinweist, dass der cGMP-Spiegel in HEK293-Zellen durch NO nicht gesteigert wird (Abbildung 52B und Abbildung 53). Im Western Blot konnte endogen die β_1 -Untereinheit nicht nachgewiesen werden, sodass kein aktives NOsGC Heterodimer gebildet werden kann (siehe Abbildung 46). HEK293-Zellen sind demnach geeignet die klonierten Konstrukte hinsichtlich ihrer Reaktivität auf NO zu untersuchen.

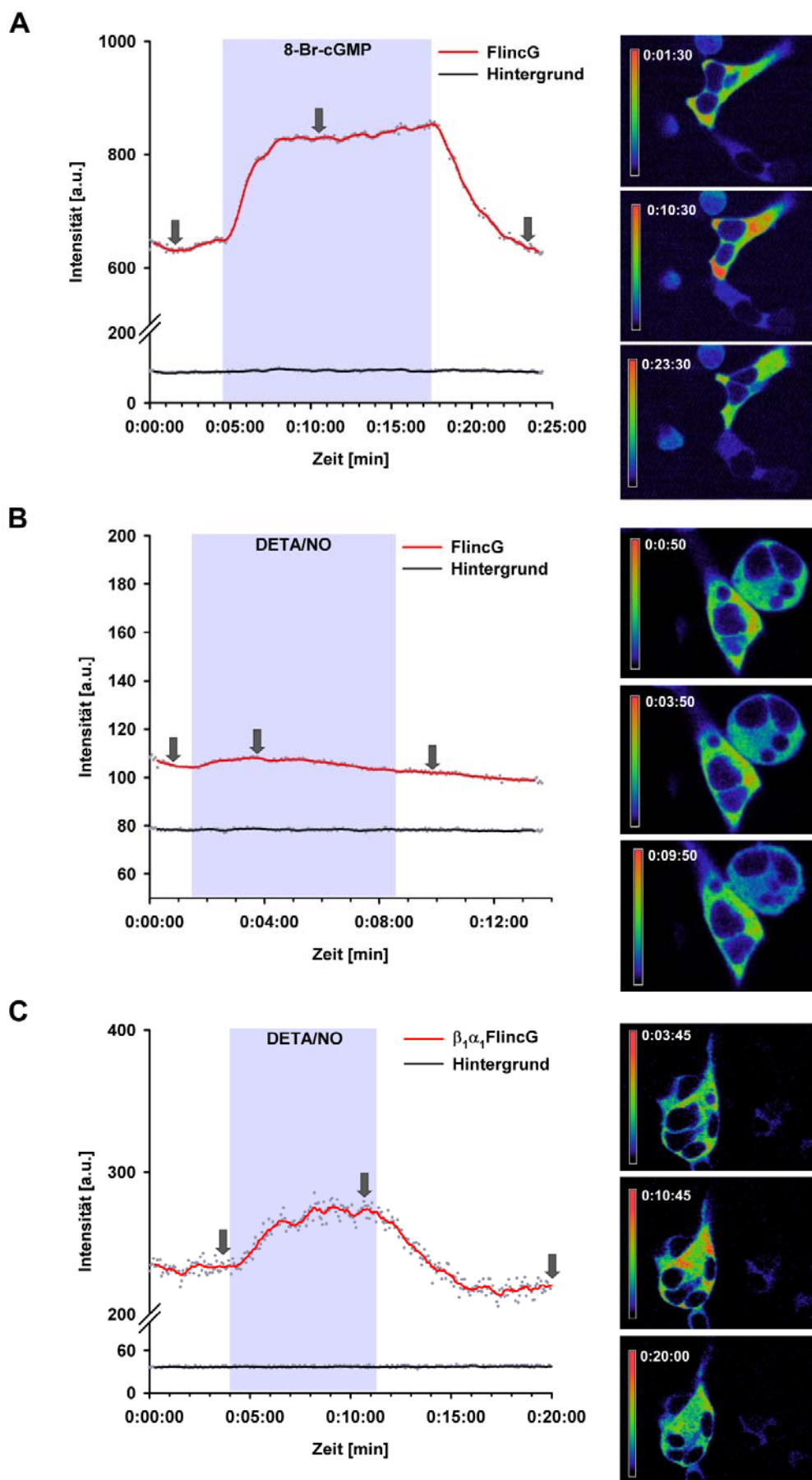
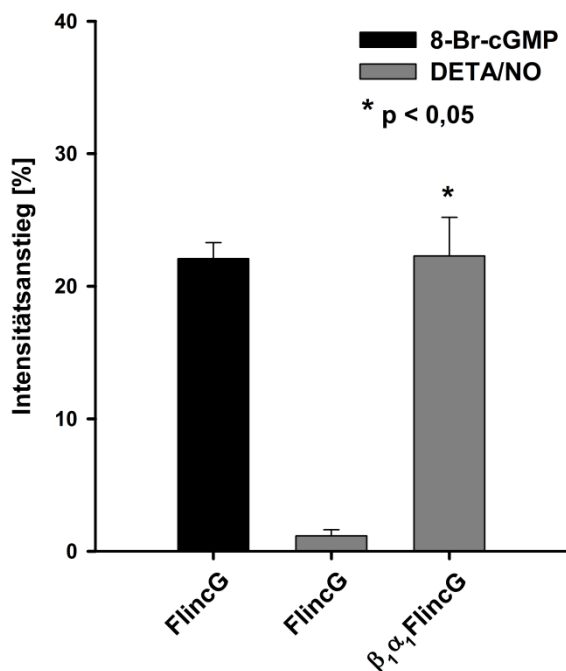


Abbildung 52: Intensitätsverlauf von FlnG und $\beta_1\alpha_1$ FlnG unter 8-Br-cGMP und DETA/NO

Dargestellt ist das gleitende Mittel aus neun Werten der Intensitätsverläufe einzelner repräsentativer HEK293-Zellen mit verschiedenen Konstrukten bei Perifusion mit 8-Br-cGMP (50 μ M) und DETA/NO (100 μ M) (rote Linien) und der Hintergrundintensität (schwarze Linien). Die grauen Punkte geben die einzelnen Messwerte wieder. Der Zeitraum, in dem mit wirkstoffhaltigem Medium umspült wurde, ist als grauer Kasten dargestellt. Die grauen Pfeile markieren die Zeitpunkte der Aufnahmen auf der rechten Seite. Die Aufnahmen zeigen die Intensität der Zellen als Farbkodierung. Rot stellt eine hohe Fluoreszenzintensität und blau eine niedrige Fluoreszenzintensität dar. **A** FlnG umspült mit 8-Br-cGMP (50 μ M). Der Graph und die Aufnahmen zeigen einen deutlichen Intensitätsanstieg der Zellen. **B** FlnG umspült mit DETA/NO als Negativkontrolle. **C** $\beta_1\alpha_1$ FlnG umspült mit DETA/NO. Der Intensitätsanstieg und die rote Farbkodierung der Zellen weisen auf einen Anstieg des cGMP-Spiegels in der Zelle hin.

Die Perifusion der mit $\beta_1\alpha_1$ FlnG transfizierten HEK293-Zellen mit einer 100 μ M DETA/NO-Lösung führte zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität ($22,3 \pm 2,9$ %). Dieser entsprach dem Intensitätsanstieg des FlnG durch 8-Br-cGMP und war dementsprechend signifikant höher als der Intensitätsanstieg des FlnG durch DETA/NO (Abbildung 52C und Abbildung 53). In Abbildung 52 sind zusätzlich Fluoreszenzaufnahmen abgebildet, in denen die Intensität der Zellen in einer Farbkodierung dargestellt ist. Die Aufnahmen für das $\beta_1\alpha_1$ FlnG Fusionsprotein zeigen unter DETA/NO eine deutliche, gelb-rote Farbkodierung der Zellen, welche eine hohe Fluoreszenzintensität anzeigt (Abbildung 52C). Die Daten belegen, dass das Fusionskonstrukt $\beta_1\alpha_1$ FlnG dafür geeignet ist, NO intrazellulär zu detektieren.

**Abbildung 53: Intensitätsanstieg von FlnG und $\beta_1\alpha_1$ FlnG mit 8-Br-cGMP und DETA/NO**

FlnG-Perifusion mit 8-Br-cGMP (50 μ M) dient als Positivkontrolle, FlnG-Perifusion mit DETA/NO (100 μ M) dient als Negativkontrolle. Der Intensitätsanstieg unter DETA/NO (100 μ M) von mit $\beta_1\alpha_1$ FlnG transfizierten HEK293-Zellen ist signifikant höher als die Negativkontrolle und erreicht den Wert von FlnG unter 8-Br-cGMP. Dargestellt ist der Mittelwert mit SEM aus mindestens acht gemessenen Zellen.

Da die NOsGC in dem Fusionskonstrukt als Sensor dient, liegt die Vermutung nahe, dass auch die intrazellulären Effekte von NOsGC-Aktivatoren untersucht werden können. Um dies zu überprüfen wurden die mit dem Fusionskonstrukt transfizierten HEK293-Zellen mit einer 10 μ M Cinaciguat-Lösung umspült und die Fluoreszenzintensität detektiert. Die fluoreszierenden Zellen durchliefen unter Cinaciguat einen deutlichen Anstieg der Intensität, die nach Auswaschen des Wirkstoffs wieder

abfiel (Abbildung 54). Die schräg abfallende Basislinie kommt durch das Ausbleichen des Fluoreszenzproteins zustande. Dies ist ein bekanntes Phänomen, dessen Stärke von der Laserintensität und der Dauer der Bestrahlung abhängt und sich trotz der Verwendung der CLEM-Technik nicht vollständig verhindern ließ (Hoebe et al., 2007) (Erläuterungen zur CLEM-Technik siehe 3.2.11.3). Beim Vergleich des prozentualen Intensitätsanstiegs durch Cinaciguat mit dem prozentualen Intensitätsanstieg durch DETA/NO stellt sich heraus, dass der durch Cinaciguat verursachte Anstieg signifikant geringer ist als der durch DETA/NO verursachte Anstieg ($10,4 \pm 1,7\%$ gegenüber $22,3 \pm 2,9\%$) (Abbildung 55). Dieser Zusammenhang spiegelt die Verhältnisse aus den Aktivitätsmessungen in der zytosolischen Fraktion (siehe Abbildung 48) und auch die Verhältnisse bei gereinigtem Enzym wider (siehe Abbildung 35). DETA/NO führt zu einem stärkeren Anstieg der cGMP-Produktion als Cinaciguat. Trägt man die normalisierten Intensitätskurven von einer Zelle unter DETA/NO im Vergleich zu einer Zelle unter Cinaciguat auf, offenbart sich eine unterschiedliche Kinetik des Intensitätsanstiegs und damit der Aktivierung der NOsGC (Abbildung 56). Cinaciguat verursacht einen steileren Intensitätsanstieg als DETA/NO und erreicht sein Plateau früher. Dieses liegt jedoch, wie schon aus Abbildung 55 hervorgeht, unter dem Niveau des durch DETA/NO verursachten Plateaus.

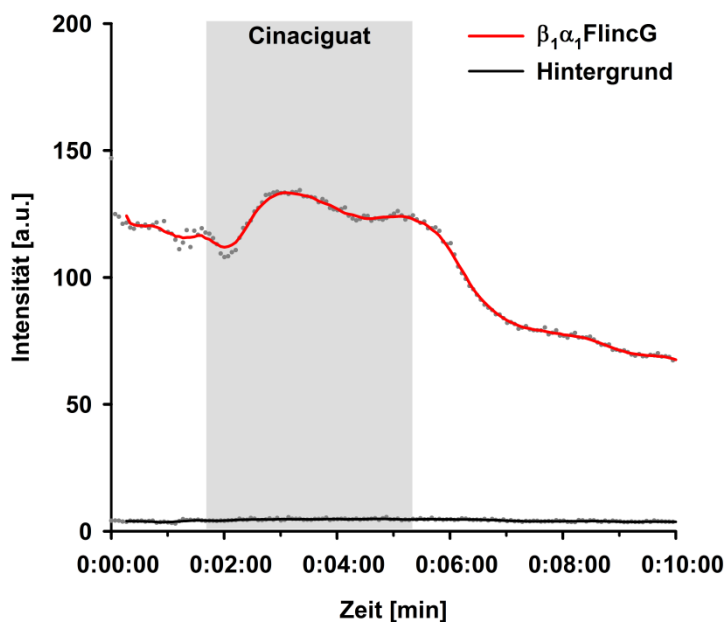


Abbildung 54: Perfusion von $\beta_1\alpha_1$ FlnG mit Cinaciguat

Dargestellt ist das gleitende Mittel aus neun Werten des Intensitätsverlaufs einer repräsentativen HEK293-Zelle mit $\beta_1\alpha_1$ FlnG bei Perfusion mit Cinaciguat ($10\ \mu\text{M}$) (rote Linie) und der Hintergrundintensität (schwarze Linie). Die grauen Punkte geben die einzelnen Messwerte wieder. Der Zeitraum, in dem mit wirkstoffhaltigem Medium umspült wurde, ist als grauer Kasten dargestellt. Cinaciguat führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität.

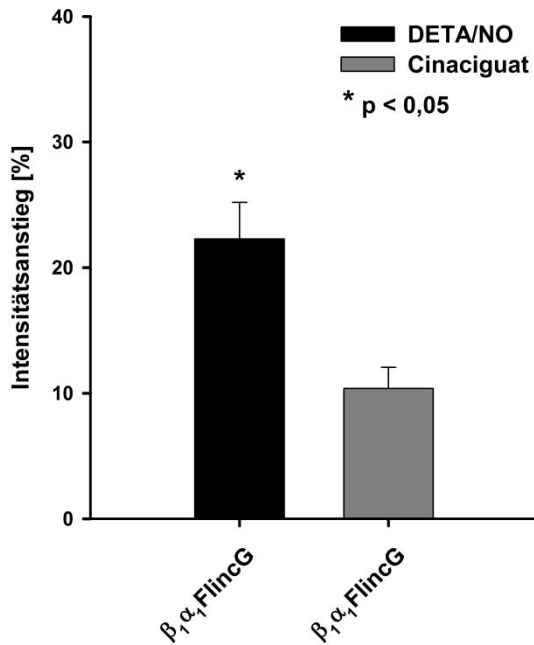


Abbildung 55: Vergleich des Intensitätsanstiegs von $\beta_1\alpha_1\text{FlnG}$ mit DETA/NO und Cinaciguat

Der Intensitätsanstieg unter DETA/NO (100 μM) von mit $\beta_1\alpha_1\text{FlnG}$ transfizierten HEK293-Zellen ist signifikant höher als der Intensitätsanstieg, der durch Cinaciguat (10 μM) ausgelöst wird. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens acht gemessenen Zellen.

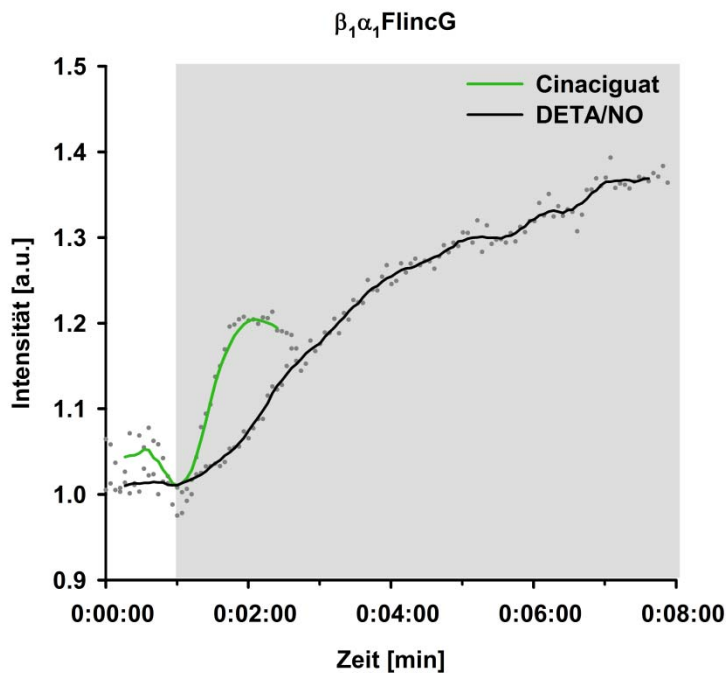


Abbildung 56: Vergleich des Intensitätsanstiegs von $\beta_1\alpha_1\text{FlnG}$ mit DETA/NO und Cinaciguat

Intensitätsverlauf von $\beta_1\alpha_1\text{FlnG}$ bei Perfusion mit DETA/NO (100 μM) (schwarze Linie) und Cinaciguat (10 μM) (grüne Linie). Um die Kurven vergleichbar zu machen wurden die Werte auf das Basalniveau direkt vor dem Anstieg normalisiert. Es ist jeweils nur der Verlauf bis zum Erreichen des Plateaus dargestellt. Die Kurven stellen das normalisierte gleitende Mittel aus neun Werten des Intensitätsverlaufs einer repräsentativen HEK293-Zelle dar. Die grauen Punkte geben die einzelnen Messwerte wieder. Der Zeitraum, in dem mit wirkstoffhaltigem Medium umspült wurde, ist als grauer Kasten dargestellt.

4.4.4. $\beta_1\text{FlnG}\alpha_2$ als Sensor der NOsGC-Aktivität an Zell-Zell-Kontakten

Nach Transfektion des NO-Sensorkonstrukts der α_2 / β_1 -Isoform, $\beta_1\text{FlnG}\alpha_2$, wurde zunächst seine Lokalisation in HEK293-Zellen überprüft. Abbildung 57 zeigt, dass dieses Konstrukt ebenso wie das Wildtyp-Enzym an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist. Damit eignet sich das Konstrukt, um die lokal begrenzte cGMP-Produktion der NOsGC durch NO-Stimulation zu untersuchen. Für die Messung mit

$\beta_1\text{FlnC}\alpha_2$ wurden verschiedene Messbereiche festgelegt. Einerseits wurden ganze Zellen gemessen, die fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte aufwiesen. Andererseits wurden in Zellen die fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte und das Zytosol einzeln gemessen und diese Werte zueinander in Bezug gesetzt (Abbildung 58). Abbildung 58A zeigt die Intensitätsänderung an Zell-Zell-Kontakten und im Zytosol von zwei Zellen, von denen die erste (1) insgesamt eine geringere Intensität aufweist als die zweite (2) Zelle. Die geringere Intensität der ersten Zelle spricht für eine geringere Überexpression des Konstrukts $\beta_1\text{FlnC}\alpha_2$ und stellt daher wahrscheinlich die endogene Verteilung der α_2 / β_1 -isoform besser dar. Im Zytosol dieser Zellen befindet sich nur ein kleiner Anteil des Fusionskonstrukts, während die Zell-Zell-Kontakte deutlich hervortreten. Bei der Perifusion der Zellen mit DETA/NO steigt die Intensität des Konstrukts an den Zell-Zell-Kontakten bei beiden Zellen deutlich an (Abbildung 58 A und B). Im Zytosol findet bei der schwächer überexprimierten Zelle kein Intensitätsanstieg statt. Die stärker überexprimierte Zelle zeigt zwar einen Intensitätsanstieg im Zytosol, dieser ist jedoch geringer als der Intensitätsanstieg an Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 58 A und B). Um den Effekt zu quantifizieren wurden bei insgesamt sechs Zellen jeweils die Intensität des Zytosols, der Zell-Zell-Kontakte und der ganzen Zellen gemessen und der Mittelwert des prozentualen Anstiegs der Intensität berechnet. Abbildung 58 C zeigt, dass die Intensität an Zell-Zell-Kontakten signifikant stärker als im Zytosol ansteigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die besondere Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten NO an der Membran abgefangen wird und dieses so zu einer lokal erhöhten cGMP-Produktion führt.

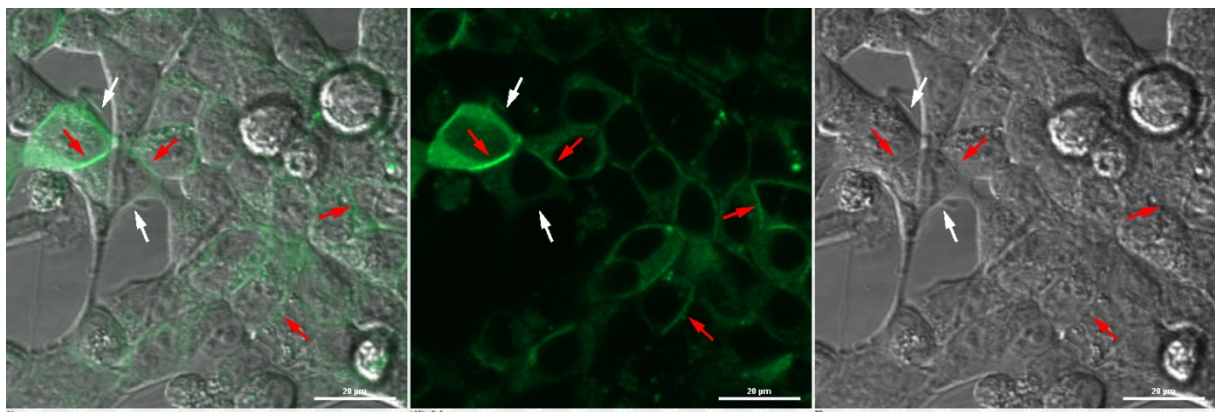
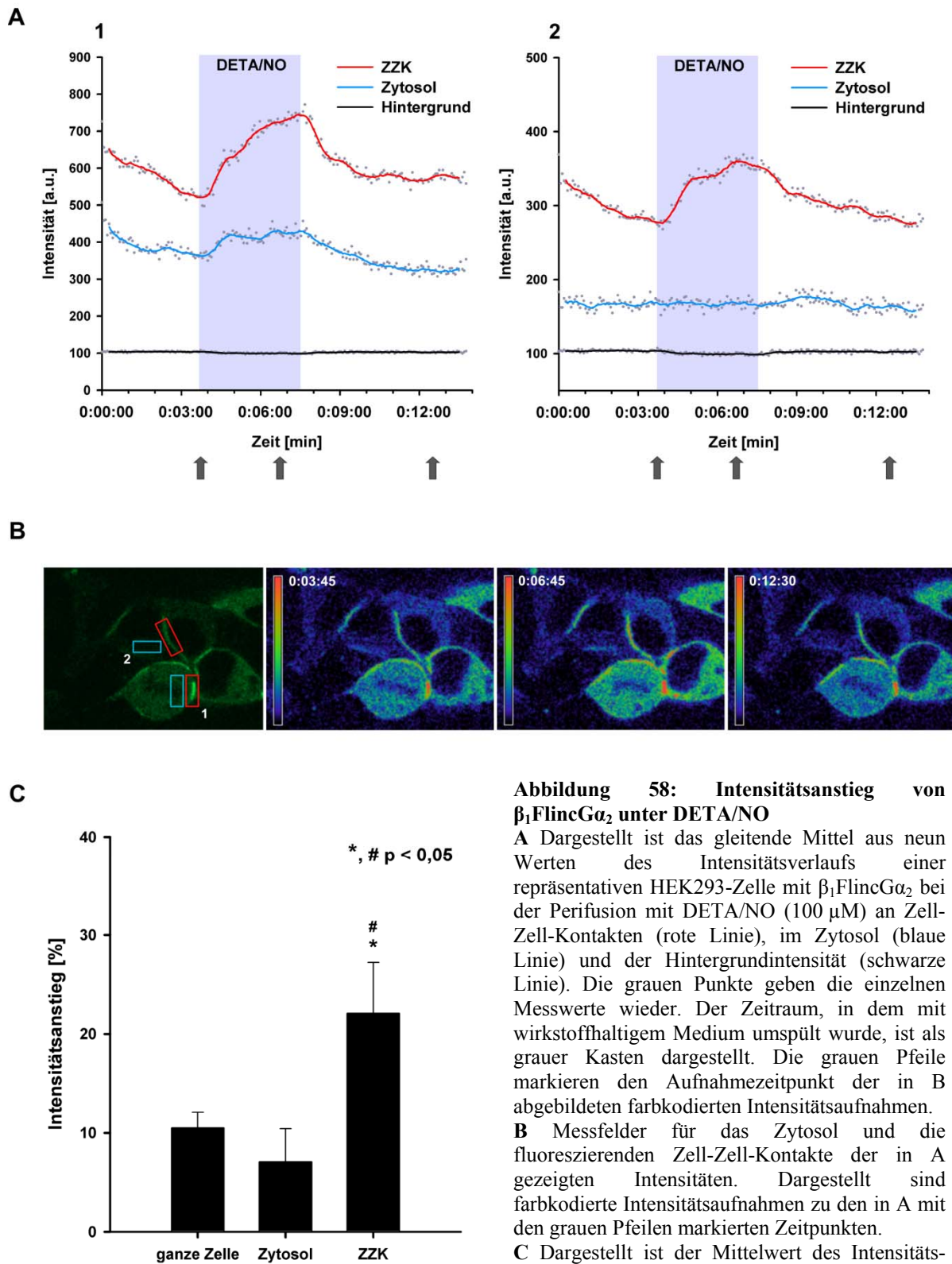


Abbildung 57: Lokalisation des Fusionskonstrukts $\beta_1\text{FlnC}\alpha_2$ in HEK293-Zellen

Links: Fluoreszenzaufnahme und Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme übereinander gelegt. Mitte: Fluoreszenzaufnahme, angeregt mit 488 nm, Emission bei 500-550 nm. Rechts: Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme. Die roten Pfeile markieren fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte, die weißen Pfeile markieren Zellränder ohne direkte Nachbarzellen.



5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit soll zur Aufklärung der vielfältigen physiologischen Prozesse des NO / cGMP-Signalwegs beitragen und untersucht verschiedene Aspekte des zentralen Enzyms dieses Signalwegs: die NOsGC. Die Erweiterung des Verständnisses des intramolekularen Aktivierungsmechanismus der NOsGC liefert dabei auch Hinweise für den Wirkmechanismus neuer Arzneistoffe. Die Untersuchung der Lokalisation der NOsGC-Isoformen trägt zum Verständnis der Funktion der NOsGC in der Zelle bei. Zusätzlich unterstützen diese Informationen die Entwicklung NOsGC-basierter Fluoreszenzsensoren, die für die Bestimmung der intrazellulären Aktivität der NOsGC und die Aufklärung intrazellulärer Wirkmechanismen von Arzneistoffen genutzt werden können.

5.1. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen NOsGC und 2'-Mant-3'-dGTP

Bisher konnte die Gesamtkristallstruktur der NOsGC noch nicht aufgeklärt werden. Innerhalb der einzelnen Domänen wurden anhand der Kristallstrukturen von Guanylat-Cyclase Homologen² Modellvorstellungen zum Aktivierungsmechanismus entwickelt. Zum Beispiel gibt es innerhalb der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit einzelne Erkenntnisse über mögliche Konformationsänderungen durch NO-Stimulation (Ma et al., 2007; Martin et al., 2010; Olea et al., 2008). In welcher Art und Weise die Domänen unter basalen Bedingungen zueinander organisiert sind wurde kürzlich in zwei Studien mit Massenspektrometrie unterstützten Cross-linking Experimenten und mit Deuterium-Austausch Massenspektrometrie untersucht (Fritz et al., 2013; Underbakke et al., 2013).

Der in dieser Arbeit verwendete innovative Ansatz, endogenes FRET zwischen Tryptophanen der NOsGC und dem Substratanalogon 2'-Mant-3'-dGTP zu nutzen, ermöglichte die Untersuchung der dynamischen Konformationsänderungen der vollständigen NOsGC unter NO-Stimulation. Bisher gibt es keine Studien, die diese NO-stimulierten Konformationsänderungen und Bewegungen der verschiedenen NOsGC-Domänen zueinander im vollständigen, intakten Enzym untersuchen. Die Vorstellungen zur Weiterleitung des Aktivierungssignals auf die katalytische Domäne beruhen auf Vergleichen der Signalweiterleitung in den membranständigen Guanylat-Cyclasen. Bei diesen wird das Signal von der amino-terminalen Domäne systematisch an die nachfolgenden Domänen bis hin zur carboxy-terminalen katalytischen Domäne weitergegeben (Ogawa et al., 2004). In Analogie dazu wurde auch für die NOsGC angenommen, dass die Bindung von NO an die amino-terminale Häm-

² HNOX: PDB ID: 3L6J (Martin et al., 2010); PDB ID: 2O0G, 2O0C, 2O09 (Ma et al., 2007); PDB ID: 3EEE (Olea et al., 2008); PAS: PDB ID 2P08, 2P04 (Ma et al., 2008); PDB ID: G4J4 (Purohit et al., 2013); CC: PDB ID 3HLS (Ma et al., 2010); CAT: PDB ID: 3ET6 (Winger et al., 2008); PDB ID: 3UVJ (Allerston et al., 2013)

Gruppe in der HNOX-Domäne über die coiled-coil Domäne an die carboxy-terminale katalytischen Domäne übertragen wird (Padayatti et al., 2004). Dieses lineare Modell der NO-Aktivierung wurde jedoch durch Ergebnisse in Frage gestellt, die eine direkte Interaktion zwischen der HNOX-Domäne und der katalytischen Domäne belegen und eine räumliche Nähe des Amino- und Carboxy-Terminus zeigen (Haase et al., 2010c; Winger und Marletta, 2005).

5.1.1. Die coiled-coil Domäne als Signal-Helix

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Daten belegen, dass sich W466 der α_1 -Untereinheit durch NO-Stimulation auf die Substratbindetasche zubewegt. W466 befindet sich gemäß Sequenzvergleich mit der Kristallstruktur der coiled-coil Domäne der β_1 -Untereinheit von Ma et al. in einer zweiten, kurzen Helix (α_B) hinter der langen amphipathischen Helix (α_A) der coiled-coil Domäne (Ma et al., 2010). Besonders in diesem Teil der coiled-coil Domäne zeigt der Sequenzabgleich eine starke Konservierung (Abbildung 59). Coiled-coil Domänen wurden in zahlreichen Enzymen wie zum Beispiel Histidin-Kinasen, Protein-Phosphatasen und cNMP-Cyclasen identifiziert. Häufig liegen sie zwischen einer amino-terminalen Sensordomäne und einer carboxy-terminalen katalytischen Domäne (Anantharaman et al., 2006). Ihnen wird daher eine Signalfunktion im Aktivierungsmechanismus dieser Enzyme zugeschrieben. In einer Mutagenesestudie wurde bereits eine regulatorische Funktion der coiled-coil Domäne der retinalen Guanylat-Cyclase beschrieben (Ramamurthy et al., 2001). Anantharaman postulierte, dass die coiled-coil Helix wie ein Schalter zwischen den Domänen fungiert, der eine konstitutive Aktivierung des Enzyms verhindert. Auf die NOsGC übertragen bedeutet dies, dass die α_B Helix der coiled-coil Domäne mit dem W466 möglicherweise als Schalter zwischen der vorgelagerten PAS-Domäne und der katalytischen Domäne dient, um das Aktivierungssignal kontrolliert zu übertragen. Die gemessenen FRET-Daten zeigen, dass unter NO-Stimulation W466 und damit vermutlich auch die kurze zweite Helix der coiled-coil Domäne an einer Konformationsänderung teilnehmen, die zu einer Aktivierung der katalytischen Domäne führt. Die Bewegung der kurzen zweiten Helix in Richtung der Substratbindestelle unterstützt die Vermutung von Anantharaman, dass diese als Signalthelix fungiert. Die Deletionsstudien von Rothkegel et al. unterstützen zusätzlich die besondere Rolle der kurzen zweiten Helix der coiled-coil Domäne. Die Deletion der Aminosäuren 460-469 der α_1 -Untereinheit, die der Deletion der gesamten kurzen zweiten Helix entspricht, führte zu einem Verlust der Enzymaktivität (Rothkegel et al., 2007).

β_1 HNOX Amino-Terminus mit W22

betal_human	MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLN	60
betal_Maus	MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLN	60
betal_Ratte	MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDQEGQFLVRIIYDHSKTYDLVAAASKVLN	60
betal_Rind	MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLN	60
betal_Manduca sexta	MYGFVNYALELLVMKTFDEETWETIKKKADVAMEGSFLVRQIYEDEITYNLITAAEVLQ	60
H-NOX_Nostoc_sp	MYGLVNKAIQDMISKHHGEDTWEAIKQKAGLEDIDFFVGMEAYSDDVTYHLVGAASEVLG	60

 β_1 katalytische Domäne, Carboxy-Terminus mit W602

betal_human	INVSEYTYRCLMSPENSDDPQFHLEHRGPVSMKGKKEPMQVWFLSRKNTGTEETKQDDD-	619
betal_Maus	INVSEYTYRCLMSPENSDDPLFHLEHRGPVSMKGKKEPMQVWFLSRKNTGTEETNEEDEN	620
betal_Ratte	INVSEYTYRCLMSPENSDDPQFHLEHRGPVSMKGKKEPMQVWFLSRKNTGTEETNQDEN-	619
betal_Rind	INVSEYTYRCLMTPENSDDPQFHLEHRGPVSMKGKKEPMQVWFLSRKNTGTEETEQUEN-	619
betal_Manduca sexta	INVS EDTYNYLMREDNHDEQFELTYRGHVTMKGAEPMQTWFLTRKIH-----	600

 α_1 coiled-coil Domäne mit W466

alpha1_human	KLKATLEQAHQALEEEKKKTVDLLCSIFPCEVAQQLWQGQVQAKKFSNVTMLFSDIV	488
alpha1_Maus	KLKATLEHAHQALEEEKKRTVDLLCSIFPSEVAQQLWQGQIVQAKKFSEVTMLFSDIV	488
alpha1_Ratte	KLKATLEHAHQALEEEKKKTVDLLCSIFPSEVAQQLWQGQIVQAKKFNEVTMLFSDIV	487
alpha1_Rind	KLKATLEQAHQALEEEKKRTVDLLCSIFPSEVARQLWQGHAVQAKRFGNVTMLFSDIV	489
alpha1_Manduca sexta	KLKNSIEEASKAVDKEREKNVSLHLIFPPHIAKRLWLGEKIEAKSHDDVTMLFSDIV	489
alpha2_Ratte	KLKATLEKTHQALEEEKKKTVDLLYSIFPGDVAQQLWQRQQVQARKFDDVTMLFSDIV	526

Abbildung 59: Konservierung der Tryptophane W22, W602 und W466

Alle drei Tryptophane sind in der NOsGC konserviert. Der Sequenzabgleich wurde mit ClustalW2 erstellt.

5.1.2. Rolle des W22 in der HNOX-Domäne

Die gemessenen Daten zeigen, dass sich bei NO-Stimulation der NOsGC neben dem W466 auch W22 in der HNOX-Domäne von β_1 auf die Mant-Gruppe in der Substratbindungsstelle zubewegt. Ma et al. beschrieben 2007 die Kristallstruktur der HNOX-Domäne von *Nostoc sp. PPC 7120*, einem NOsGC Homolog aus einem Cyanobakterium (Ma et al., 2007). Aus ihr geht hervor, dass sich das W22 der β_1 -Untereinheit in der α B Helix der HNOX-Domäne befindet. Der Sequenzvergleich zeigt, dass W22 hoch konserviert ist (siehe Abbildung 59). Durch die Bindung von NO kommt es nach Ma et al. am Eisenzentralatom zunächst zur Bildung eines sechsfach-kordinierten NO-Häm-Komplex, der schließlich in einen fünffach-kordinierten NO-Häm-Komplexes übergeht. Dieser Komplex geht mit einer starken Verbiegung des Häms einher, die zu einer raumübergreifenden Konformationsänderung des Amino-Terminus der HNOX-Domäne führt. Dabei kommt es zu einer Drehung der amino-terminalen helikalen Regionen einschließlich der α B-Helix mit dem W22 um etwa 20° (Ma et al., 2007). In der Kristallstruktur der HNOX von *Thermoanaerobacter tengcongensis* beschrieben Olea et al. eine Verschiebung dieser Helix um 4,9 Å (Olea et al., 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Drehung und die Bewegung der amino-terminalen Region durch NO-Stimulation W22 näher an die katalytische Domäne heranbringen.

In bisherigen Versuchen mit fluoreszierenden Proteinen vom Typ des GFP gelang es nicht eine Veränderung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers durch die Stimulation der NOsGC mit NO

zu detektieren (Haase et al., 2010c). Die Markierung der amino-terminalen HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit führte in verschiedenen Studien zu einem nicht durch NO aktivierbaren Enzym, sodass Untersuchungen von domänenübergreifenden Konformationsänderungen bisher nicht möglich waren (Haase et al., 2010c; Lee et al., 2000; Zabel et al., 1999). Durch die Verwendung des W22 als endogenen FRET-Donor der NOsGC gelang es in dieser Arbeit die durch NO-Stimulation auftretenden dynamischen Konformationsänderungen der HNOX-Domäne im Verhältnis zur katalytischen Domäne zu untersuchen.

Allerdings zeigte sich auch in den Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Toleranz für Veränderungen in der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit gering ist. Der im Rahmen der Mutationen für die FRET-Messungen durchgeführte Austausch des W22 der β_1 -Untereinheit zu Alanin führte zu einem Verlust der NO-Aktivierbarkeit. Aus den Absorptionsmessungen ergibt sich, dass die Mutante $\alpha_1\text{S} / \beta_1\text{W22A}$ kein Häm enthält. Der Verlust des Häms könnte dadurch verursacht sein, dass W22 direkt an der Häm-Bindung beteiligt ist. Wie oben diskutiert befindet sich W22 in der αB -Helix der β_1 -HNOX. Aus der Kristallstruktur von Ma et al. ergibt sich, dass W22 nicht in der räumlichen Nähe zur Häm-Bindetasche liegt (Ma et al., 2007). Auch in Studien, in denen die Aminosäuren der Häm-Bindetasche untersucht wurden, gab es keine Hinweise auf eine direkte Beteiligung des W22 (Baskaran et al., 2011a, b; Schmidt et al., 2004). Namiki et al. grenzten mit Hilfe von β_1 -Deletionsmutanten den für die Häm-Bindung essentiellen Bereich auf die Aminosäuren 60-195 der β_1 -HNOX-Domäne ein, sodass eine direkte Beteiligung des W22 danach sogar ausgeschlossen ist (Namiki et al., 2001). Der NOsGC-Aktivator Cinaciguat bindet als Häm-Mimetikum ähnlich wie Häm in der Bindetasche der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit (Martin et al., 2010). Der Befund, dass auch Cinaciguat nur eine sehr geringe Steigerung der Aktivität der Mutante bewirkt, deutet darauf hin, dass W22 möglicherweise für die Aufrechterhaltung des Zugangs zur Häm-Bindetasche wichtig ist. Die Mutation könnte demnach den Einbau von Häm in die NOsGC verhindern und auch das Eintreten von Cinaciguat erschweren. Rekonstitutionsversuche der Mutante mit Hemin in Gegenwart von Tween 20 und anschließenden spektroskopischen Untersuchungen und Aktivitätsmessungen könnten möglicherweise Hinweise in dieser Richtung liefern. Förster et al. zeigten mit dieser Methode, dass sich eine hämfreie Mutante ($\alpha_1 / \beta_1\text{H105F}$) mit Hemin und Protoporphyrin IX rekonstituieren lässt (Förster et al., 1996).

5.1.3. Art der W22/W602 Interaktion

In der unveränderten NOsGC wird die Detektion der Bewegung des W22 mittels FRET über eine Fluoreszenzlöschung der W22-Fluoreszenz durch W602 verhindert. Eine mögliche Erklärung für die Fluoreszenzlöschung ist das Auftreten von Homo-FRET. Dieser beschreibt den Energietransfer von einem Tryptophan auf ein zweites (Lakowicz, 1999) (siehe 4.1.6). Er kann zum Beispiel für die

Bestimmung von Abständen in Proteinen genutzt werden (Lakowicz et al., 1987; Moens et al., 2004). Die Emissionsmaxima der Mutanten zeigten eine Linksverschiebung zu kürzeren Wellenlängen, die zu einer Überlappung der Emissions- und Absorptionsspektren führt. Die Voraussetzung für Homo-FRET zwischen W22 und W602 sind demnach erfüllt und eine Interaktion dieser Art ist daher sehr wahrscheinlich. Zusätzlich bestärkt diese Interaktion die Vermutung, dass es durch NO-Stimulation zu einer direkten Wechselwirkung zwischen der β_1 -HNOX-Domäne und der katalytischen Domäne kommt. Nicht nur der Abstand zwischen W22 und der Mant-Gruppe verringert sich, sondern auch der Abstand zwischen W22 und dem W602 der katalytischen Domäne.

5.1.4. Mögliche Interaktion zwischen der Häm-Gruppe und W22

Da sich W22 in der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit befindet, könnte auch die nahegelegene Häm-Gruppe ein möglicher FRET-Akzeptor für die W22-Fluoreszenz sein. Dies ist ein bekanntes Phänomen und soll zum Beispiel für die geringe intrinsische Fluoreszenz von Myoglobin verantwortlich sein (Gryczynski et al., 1993). Unter NO-Stimulation würde die Fluoreszenzlöschung allerdings zunehmen, weil die Verschiebung des Absorptionsspektrums des Häms von 430 nm zu 399 nm zu einer verstärkten spektralen Überlappung mit dem Emissionsspektrum des Tryptophans führt (Kosarikov et al., 2001). Da jedoch nach NO-Stimulation ein Anstieg des FRET auf die Mant-Gruppe anstatt eines Abfalls des FRET detektiert wurde, ist es unwahrscheinlich, dass die Fluoreszenz von W22 durch die Häm-Gruppe gelöscht wird. Dies steht auch im Einklang mit der Beobachtung, dass sich die basale FRET-Effizienz der hämfreien α_1 / β_1 H105A Mutante und des hämhaltigen Wildtyp-Enzyms nicht unterscheiden.

5.1.5. Modell der NOsGC Signaltransduktion basierend auf den FRET-Daten

Fasst man die gemessenen Daten zum Energietransfer zwischen den Tryptophanen und dem Substratanalogon 2'-Mant-3'-dGTP zusammen, ergibt sich folgendes Modell des Aktivierungsmechanismus: Unter basalen Bedingungen trägt W466 der α_1 -Untereinheit bereits zum Energietransfer auf die Mant-Gruppe bei. Infolge der NO-Stimulation bewegt sich W466 und die kurze Helix der coiled-coil Domäne auf die Mant-Gruppe in der Substratbindungsstelle zu und es kommt zu dem gemessenen Anstieg der FRET-Effizienz des Wildtyp-Enzyms. Ebenso bewegt sich W22 der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit auf die Mant-Gruppe zu. Dieses kann seine Energie jedoch nicht auf die Mant-Gruppe übertragen, sondern überträgt sie stattdessen durch das Auftreten eines Homo-FRET auf das W602 der katalytischen Domäne. In der Mutante α_1S / β_1 W602F, der W602 fehlt, findet dieser Homo-FRET nicht statt. Das W22 überträgt seine Energie stattdessen wie

das W466 auf die Mant-Gruppe. Es kommt zu dem beobachteten erhöhten Anstieg der FRET-Effizienz.

5.1.6. Vergleich mit bestehenden Modellen der NOsGC

Überträgt man die Ergebnisse auf das Modell der Gesamtstruktur der NOsGC von Fritz et al 2013, ergibt sich der Aktivierungsmechanismus als Zusammenspiel zwischen der coiled-coil Domäne, der HNOX-Domäne und der katalytischen Domäne. Fritz et al. untersuchten eine carboxy-terminal trunkierte NOsGC aus *Manduca sexta* mit analytischer Ultrazentrifugation, Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) und mit Massenspektrometrie unterstützten Cross-linking Experimenten (Fritz et al., 2013). Sie beschrieben 20 intramolekulare Wechselwirkungen zwischen definierten Aminosäuren verschiedener Domänen und postulierten ein Modell der NOsGC mit einer parallelen coiled-coil Domäne auf der die HNOX-Domänen und die PAS-Domänen angeordnet sind (Abbildung 60).

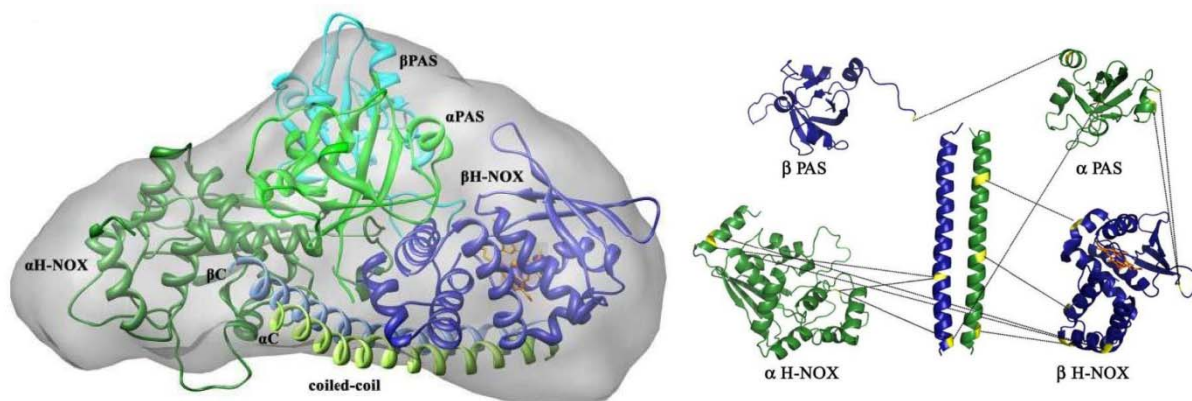


Abbildung 60: Strukturmodell der NOsGC von Fritz et al. 2013

Untersuchungen einer carboxy-terminal trunkierten NOsGC aus *Manduca sexta* (tobacco hornworm) mit analytischer Ultrazentrifugation, Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) und cross-linking Massenspektrometrie ergaben 20 intramolekulare Wechselwirkungen zwischen definierten Aminosäuren der verschiedenen Domänen. Fritz et al. 2013 postulierten ein Modell der NOsGC mit einer parallelen coiled-coil Domäne, auf der die HNOX-Domänen und die PAS-Domänen angeordnet sind

Unter Verwendung der gemessenen FRET-Daten wurde die katalytische Domäne unterhalb der coiled-coil Domäne in räumlicher Nähe zum Carboxy-Terminus der coiled-coil Domäne der α_1 -Untereinheit und der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit in das Modell von Fritz et al. eingepasst (Abbildung 61).

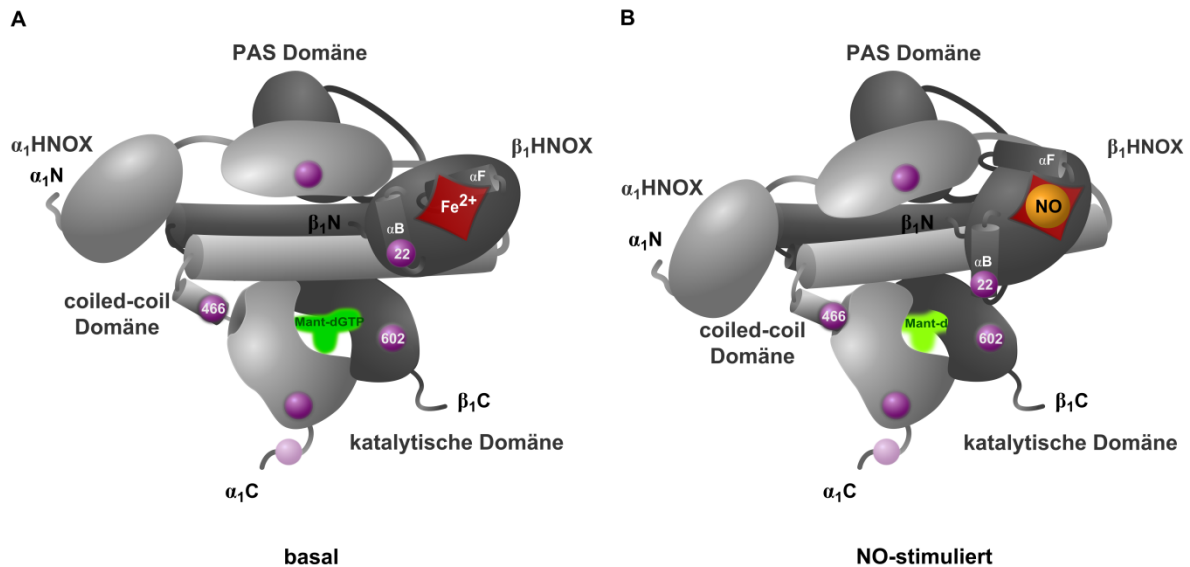


Abbildung 61: Modell der NO-stimulierten Aktivierung der NOsGC

Das Modell wurde basierend auf dem Modell von Fritz et al., 2013 entwickelt. Im basalen Zustand trägt W466, nicht jedoch W22, zum Energietransfer auf die Mant-Gruppe bei. Durch NO-Stimulation bewegt sich die kurze zweite Helix der α_1 -coiled-coil Domäne, in der W466 enthalten ist, und die α_B Helix der HNOX-Domäne von β_1 mit dem W22 auf die Mant-Gruppe in der Substratbindestelle zu. W466 verursacht dabei den sichtbaren Anstieg der FRET-Effizienz des Wildtyp-Enzyms. Die Energie des W22 wird aufgrund des Auftretens von Homo-FRET zum W602 nicht auf die Mant-Gruppe sondern auf W602 übertragen.

Basierend auf dem Vergleich der Kristallstrukturen der ungebundenen und der NO-gebundenen HNOX-Domäne von *Nostoc sp. PCC 7120* zogen Ma et al. Rückschlüsse auf die Konformationsänderungen der HNOX-Domäne durch NO-Stimulation: Einerseits kommt es durch die Verbiegung der Häm-Gruppe zu einer Drehung der amino-terminalen helikalen Regionen einschließlich der α_B -Helix mit dem W22. Andererseits kommt es zum Bruch der Bindung zwischen dem H105 und dem Eisenzentralatom (Ma et al., 2007). Der Bruch dieser Bindung führt vermutlich zur Bewegung der α_F -Helix, in der sich das H105 befindet, und dient zur Weiterleitung des Aktivierungssignals an nachgeschaltete Domänen (Martin et al., 2010). Die Bewegungen der beiden Helices auf unterschiedlichen Seiten der Häm-Gruppe lassen sich gut mit dem Befund dieser Arbeit in Einklang bringen, dass das Aktivierungssignal von der HNOX-Domäne über zwei unterschiedliche Domänen an die katalytische Domäne weitergegeben wird. Die gemessenen Daten zeigen, dass die Bewegung der amino-terminalen Regionen auf der einen Seite der Häm-Gruppe direkt zu einer Annäherung des W22 in der α_B Helix an die katalytische Domäne führen. Die NO-induzierte Bewegung der α_F Helix mit dem H105 könnte auf die zweite kurze Helix der coiled-coil Domäne mit dem W466 übertragen werden. Diese Übertragung wird möglicherweise durch die PAS-Domäne der α_1 -Untereinheit vermittelt. In Übereinstimmung damit beschrieben Underbakke et al. eine direkte Interaktion der α_F Helix mit der PAS-Domäne und Fritz et al. zeigten, dass die PAS-Domäne der α_1 -Untereinheit in direktem Kontakt zur HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit steht (Fritz et al., 2013; Underbakke et al., 2013). Die zentrale Rolle der α_1 -PAS-Domäne wurde auch von Koglin und Behrends belegt. Sie

zeigten, dass die α_1 -PAS-Domäne (Aminosäuren 259-364) im Gegensatz zur α_1 -HNOX-Domäne notwendig ist für die Aktivierung der NOsGC durch NO und NOsGC-Stimulatoren (Koglin und Behrends, 2003).

Die für dieses Modell notwendige Anordnung der HNOX-Domäne in räumlicher Nähe zur katalytischen Domäne wird durch Arbeiten mehrerer Arbeitsgruppe unterstützt. Sie geben Hinweise darauf, dass nicht nur eine Signaltransduktion von den vorgelagerten Domänen über die coiled-coil Domäne hin zur katalytischen Domäne stattfindet, sondern dass es auch zu einer direkten Interaktion zwischen der HNOX und der katalytischen Domäne kommt (Allerston et al., 2013; Haase et al., 2010c; Winger et al., 2008; Winger und Marletta, 2005). Winger und Marletta beschrieben 2005 eine direkte Interaktion der isolierten HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit mit der dimerisierten katalytischen Domäne der Guanylat-Cyclase. Mit steigenden Konzentrationen der isolierten HNOX-Domäne sank die Aktivität der separaten katalytischen Domäne. Winger und Marletta leiteten daraus eine autoinhibitorische Funktion der HNOX-Domäne in Abwesenheit von NO ab. Sie entwickelten ein Modell in dem NO diese autoinhibitorische Funktion aufhebt. Nach den Daten der vorliegenden Arbeit dagegen ist die HNOX-Domäne aktiv an der Aktivierung der katalytischen Domäne beteiligt. Durch die Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen fluoreszenzmarkierten Amino- und Carboxy-Termini der Guanylat-Cyclase Untereinheiten konnte gezeigt werden, dass sich die HNOX-Domäne und die katalytische Domäne in einem Abstand von 62-66 Å befinden (Haase et al., 2010c). Außerdem gelang es, ein funktionelles, NO-aktivierbares Fusionsprotein herzustellen, in dem der Carboxy-Terminus der β_1 -Untereinheit über ein Fluoreszenzprotein mit dem Amino-Terminus der α_1 -Untereinheit verbunden ist (Haase et al., 2010c). In einer zweiten Studie führte sogar die direkte Fusion des Carboxy-Terminus der β_1 -Untereinheit mit dem Amino-Terminus der α_1 -Untereinheit zu einem vollständig funktionsfähigen Enzym, welches auch in Bezug auf die Aktivierung durch die Ciguarte ein gleiches Verhalten wie das Wildtyp-Enzym aufweist (Haase et al., 2010a). Diese Daten stehen im Einklang mit dem hier vorgelegten Befund, dass sich W22 der amino-terminalen HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit in räumlicher Nähe zum carboxy-terminalen W602 der katalytischen Domäne der β_1 -Untereinheit befindet.

5.1.7. Auswirkung auf die katalytische Domäne: Das Zangenmodell

In der Gesamtheit betrachtet lassen die FRET-Daten dieser Arbeit vermuten, dass die zweite kurze Helix der coiled-coil Domäne der α_1 -Untereinheit mit dem W466 und die α_B Helix der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit mit dem W22 eine Zange formen. Diese bringt die katalytische Domäne nach NO-Stimulation in ihre aktive Konformation. Winger et al. 2008 verglichen die Kristallstruktur der inaktiven katalytischen Domäne der NOsGC von *Chlamydomonas reinhardtii*, einer Grünalge, mit

der aktiven Konformation der katalytischen Domäne der Adenylat-Cyclase (Winger et al., 2008). Die Autoren beschrieben, dass der Aufbau der katalytischen Domäne der Adenylat-Cyclase weitgehend mit dem der katalytischen Domäne der NOsGC übereinstimmt und schlossen daraus auf einen ähnlichen Mechanismus der Aktivierung für die NOsGC wie für die Adenylat-Cyclase. Sie vermuten, dass die Katalyse der NOsGC wie die Katalyse der Adenylat-Cyclase mit einem Schließen der beiden Untereinheiten um das gebundene Nukleotid einhergeht, welches mit einer Annäherung der beiden Untereinheiten verbunden ist. In der Adenylat-Cyclase führt die Bindung der Switch helix II des Aktivators $G_s\alpha$ zu einem zweistufigen Aktivierungsmechanismus der dimeren katalytischen Domäne (Tesmer und Sprang, 1998; Tesmer et al., 1997; Tesmer et al., 1999; Zhang et al., 1997). Im ersten Schritt kommt es zu einer Rotation der C2-Schleife, welche die Substratbindestelle für die Katalyse vorbereitet. Dabei rücken die für die Substratbindung notwendigen Aminosäuren der einen Domäne näher an die entsprechenden Aminosäuren der anderen Domäne heran. Im zweiten Schritt schließt sich die katalytische Domäne weiter um das gebundene Nukleotid und bringt es in eine für die Katalyse optimale Konformation. Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur der dimeren katalytischen Domäne der humanen Guanylat-Cyclase bestätigt die Überlegungen einer ähnlichen Konformationsänderung der katalytischen Domänen der beiden Enzyme (Allerston et al., 2013). Demnach durchläuft die α -Untereinheit der NOsGC eine Rotation um 26° bei der sich einige Aminosäuren um bis zu 10 Å verschieben. Allerston et al. vermuten, dass der Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation einem Schaltmechanismus gleichkommt, der nur im vollständigen Enzym auftritt. Dieser Schaltmechanismus soll entweder durch die Substratbindung oder durch eine Interaktion mit der HNOX-Domäne von β_1 ausgelöst werden. Die Autoren halten es auch für möglich, dass die vorgelagerte coiled-coil Domäne eine Begrenzung des Bewegungsfreiraums der katalytischen Domäne bedingt, die dazu führt, dass die Amino-Termini der katalytischen Domäne in räumliche Nähe gebracht werden. Das in dieser Arbeit entwickelte Zangenmodell erfüllt die Voraussetzungen, um die Annäherung der beiden katalytischen Untereinheiten und das Schließen der katalytischen Domäne um das gebundene Nukleotid zu erklären.

Eine mögliche Bindestelle / Interaktionsstelle in der katalytischen Domäne für Signalthelices der coiled-coil Domäne oder der HNOX-Domäne wurde von Winger et al. bereits postuliert (Winger et al., 2008). Der Vergleich der Kristallstruktur der katalytischen Domäne der NOsGC und der katalytischen Domäne der Adenylat-Cyclase ergab, dass beide Enzyme eine Furche aufweisen, in die eine Helix binden kann. In der Adenylat-Cyclase bindet die Switch helix II des Aktivators $G_s\alpha$ in diese Furche. Sie befindet sich zwischen den Schleifen $\alpha 1$ - $\alpha 2$ und $\alpha 3$ - $\beta 4a$ der C2-Domäne. In der dimeren NOsGC entspricht die Lage der Furche entweder den Aminosäuren 495-497 und 561-569 der α_1 -Untereinheit der Ratte oder den Aminosäuren 436-442 und 509-516 der β_1 -Untereinheit der Ratte. Winger et al. stellten die Hypothese auf, dass an dieser Stelle eine Interaktion mit der HNOX-Domäne oder mit einer der carboxy-terminalen Domänen stattfinden könnte. Möglicherweise bindet entweder die zweite

kurze Helix der coiled-coil Domäne mit W466 oder die α B Helix der HNOX-Domäne mit W22 in die Furche zwischen den Schleifen α 1- α 2 und α 3- β 4, um eine Konformationsänderung der katalytischen Domäne und die gesteigerte Katalyse zu bewirken.

5.1.8. Veränderung der Umgebung der Mant-Gruppe in der katalytischen Domäne

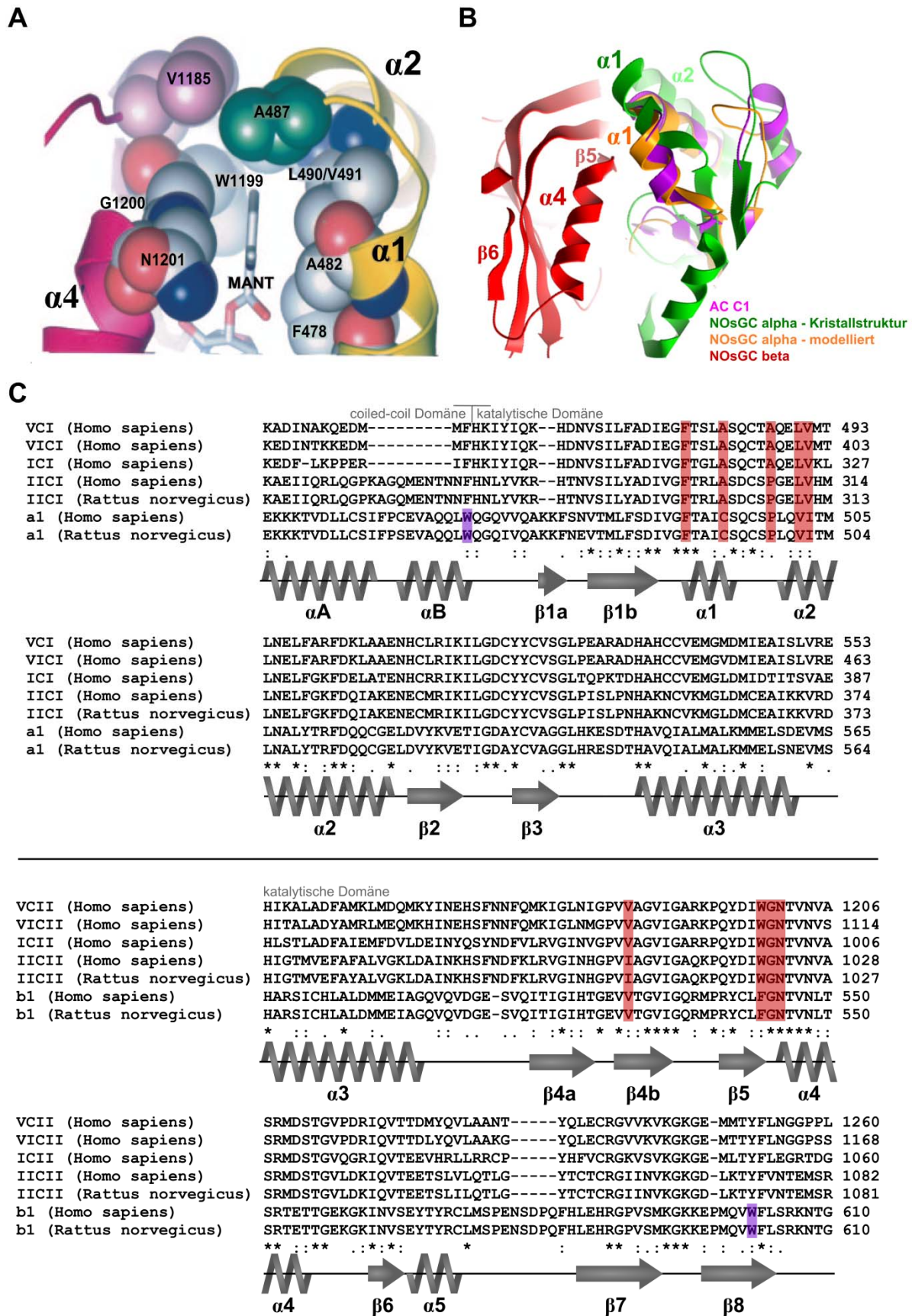
Ein differenziertes Bild über den Einfluss der NO-Aktivierung auf die katalytische Domäne ergibt sich bei detaillierter Betrachtung der Lage der Mant-Gruppe in der Substratbindetasche. Die Mant-Gruppe an der 2'-Position des Riboserings von GTP bindet in der Adenylat-Cyclase keilförmig in eine hydrophobe Bindetasche zwischen die C1- und C2-Untereinheit der katalytischen Domäne (Gille et al., 2004; Mou et al., 2005) (Abbildung 62A). Diese hydrophobe Tasche der Adenylat-Cyclase ist in der NOsGC konserviert und in beiden Untereinheiten der NOsGC befinden sich Aminosäuren, die an der Ausformung der Tasche beteiligt sind (Liu et al., 1997; Mou et al., 2005; Sunahara et al., 1998; Tesmer et al., 1997) (Abbildung 62C). Bei einem Sequenzabgleich der C2-Domäne der Adenylat-Cyclase mit der katalytischen Domäne der NOsGC zeigt sich, dass die an der Bindung der Mant-Gruppe beteiligten Aminosäuren der β ₁-Untereinheit hauptsächlich zwischen dem β 5-Faltblatt und der α 4-Helix der katalytischen Domäne der β ₁-Untereinheit liegen. Der Sequenzvergleich zwischen der C1-Domäne der Adenylat-Cyclase und der α ₁-Untereinheit macht deutlich, dass sich weitere an der Bindung der Mant-Gruppe beteiligte Aminosäuren in der α 1 und α 2-Helix der katalytischen Domäne der α ₁-Untereinheit befinden. Das bedeutet, dass die an der Bindung der Mant-Gruppe beteiligten Aminosäuren in direkter Nachbarschaft zu der durch Winger et al. beschriebenen Furche liegen (siehe oben). Da sich unter NO-Stimulation das W466 der α ₁-Untereinheit auf die Mant-Gruppe zu bewegt und diese sich in der Nähe der beschriebenen Furche befindet, ist es wahrscheinlich, dass die zweite kurze Helix der coiled-coil Domäne mit dem W466 als Signalthelix in die Furche bindet, in die bei der Adenylat-Cyclase die Switch helix II des Aktivators G_s α bindet.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Messung der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe liefert wertvolle Informationen über den geometrischen Zustand der katalytischen Domäne und der Substratbindetasche. Die Ergebnisse weisen auf ein Schließen der katalytischen Domäne um das gebundene Nukleotid hin und sind daher gut mit den Daten von Winger et al. 2008 und Allerston et al. 2013 vereinbar. Bei zunehmend hydrophober Umgebung steigt die Fluoreszenz der Mant-Gruppe an (Hiratsuka, 1983). Der deutliche Anstieg der Mant-Eigenfluoreszenz beim Wildtyp-Enzym infolge der NO-Stimulation weist daher auf einen starken Anstieg der Lipophilie hin. Der Anstieg könnte durch eine Verdrängung von Flüssigkeit aus der Substratbindetasche oder die Ausrichtung lipophiler Aminosäurereste in Richtung der Substratbindetasche ausgelöst sein. Nach dem Vergleich der Kristallstruktur der offenen Konformation der katalytischen Domäne der humanen NOsGC mit der

geschlossenen Konformation der Adenylat-Cyclase, verschiebt sich aktivierungsbedingt die $\alpha 1$ -Helix der katalytischen Domäne der α_1 -Untereinheit um 7 Å in Richtung der $\alpha 4$ -Helix der katalytischen Domäne der β_1 -Untereinheit (Abbildung 62B) (Allerston et al., 2013). Wie oben beschrieben und aus Abbildung 62C ersichtlich, befinden sich die hydrophoben Aminosäuren, die an der Bindung der Mant-Gruppe beteiligt sind in der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Helix der katalytischen Domäne der α_1 -Untereinheit und zwischen dem $\beta 5$ -Faltblatt und der $\alpha 4$ -Helix der katalytischen Domäne der β_1 -Untereinheit. Nach den Daten von Allerston et al. bedeutet dies, dass sich die hydrophobe Bindetasche der Mant-Gruppe durch NO-Stimulation verengt, indem sich die überwiegend hydrophoben Aminosäuren annähern (α_1 F489, α_1 C193, α_1 P498, α_1 V501, α_1 I502 und β_1 V529, β_1 F543, β_1 G544, β_1 N545, Nummerierung der Ratte). Die Lipophilie der Bindetasche steigt dadurch an und es kommt zu dem beobachteten Anstieg der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe. Die Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe kann demnach als Reporter für die Bewegung der $\alpha 1$ -Helix der katalytischen Domäne der α_1 -Untereinheit auf die $\alpha 4$ -Helix der katalytischen Domäne der β_1 -Untereinheit dienen. Dies unterstützt somit die aus der Modellierung der Kristallstrukturen gewonnenen Daten von Winger et al und Allerston et al.

Abbildung 62: Bindetasche der Mant-Gruppe

A Hydrophobe Bindetasche der Mant-Gruppe in der Adenylat-Cyclase nach Mou et al., 2005. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die humane Adenylat-Cyclase V. **B** Kristallstruktur der katalytischen Domäne der humanen Guanylat-Cyclase aus Allerston et al., 2013 in gedrehter Ansicht. Allerston et al modellierten den von ihnen kristallisierten offenen Zustand der katalytischen Domäne der NOsGC auf die Kristallstruktur der geschlossenen Konformation der Adenylat-Cyclase. Sie fanden heraus, dass sich die $\alpha 1$ -Helix der α_1 -Untereinheit auf die $\alpha 4$ -Helix der β_1 -Untereinheit zu bewegt. Dargestellt sind: die Kristallstruktur der Adenylat-Cyclase in Magenta, die Kristallstruktur der α_1 -Untereinheit der NOsGC in Grün, die Kristallstruktur der β_1 -Untereinheit in Rot und die auf die Adenylat-Cyclase modulierte α_1 -Untereinheit der NOsGC in Gelb. **C** Sequenzvergleich der C1-Domäne der Adenylat-Cyclasen mit der α_1 -Untereinheit der NOsGC (oben) und Sequenzvergleich der C2-Domäne der Adenylat-Cyclasen mit der β_1 -Untereinheit der NOsGC (unten). Die an der Bindung der Mant-Gruppe beteiligten Aminosäuren der Adenylat-Cyclase sind in den Untereinheiten der NOsGC konserviert bzw. durch Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt (rote Markierungen). * markiert identische Aminosäuren, : markiert Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften, . markiert Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. Unmarkierte Aminosäuren weisen keine Ähnlichkeiten auf. In Violett sind das W466 (Ratte) der coiled-coil Domäne der α_1 -Untereinheit und das W602 der β_1 -Untereinheit markiert. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW2 erstellt und die Anordnung der Sekundärstruktur von Winger et al., 2008 übernommen.



5.1.9. Konformationsänderung der katalytischen Domäne durch Stimulation

Die Befunde zum Regenerationseffekt der NOsGC-Stimulatoren auf die NO-Aktivierung der Mutante α_1 S W466F / β_1 , gibt Hinweise für das Verständnis des Aktivierungsmechanismus dieser neuen Wirkstoffklasse. Die Bindungsstelle der Stimulatoren YC-1, BAY 41-2272 und BAY 41-8543 ist noch nicht aufgeklärt. Bisher wurden unterschiedlichste Bindungsmechanismen postuliert und eine eindeutige Bindungsstelle der Stimulatoren wurde noch nicht identifiziert. Zum Beispiel wurde die HNOX-Domäne der α_1 -Untereinheit als mögliche Bindestelle der Stimulatoren in Deletionsstudien, Photolabeling-Studien und Docking-Studien beschrieben (Hering et al., 2006; Hu et al., 2008; Pal und Kitagawa, 2010; Stasch et al., 2001). Mutations-Studien identifizierten eine pseudosymmetrische Bindetasche, die der Bindungsstelle der Adenylat-Cyclase für Forskolin entspricht, als mögliche Bindungsstelle der Stimulatoren (Friebe et al., 1999; Lamothe et al., 2004). In mehreren Resonanz-Raman-Untersuchungen wurde ein Einfluss der NOsGC-Stimulatoren in Kombination mit NO oder CO auf die Geometrie der Häm-Gruppe und eine Verformung der Häm-Bindetasche herausgestellt (Denninger et al., 2000; Ibrahim et al., 2010; Makino et al., 2003; Yoo et al., 2012). Yoo et al. zeigten mit Hilfe der transienten Absorptionsspektroskopie, dass der Einfluss von BAY 41-2272 auf die NOsGC dem Einfluss des Stimulators auf eine verkürzte isolierte HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit (AS 1-200) entspricht (Yoo et al., 2012). Durch BAY 41-2272 kam es zu Modifikationen der einzelnen Bindungsphasen von CO in beiden Proteinen. Die Autoren schlossen daraus, dass sich die Bindungsstelle von BAY 41-2272 in der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit befindet. BAY 41-2272 führt demnach in Kombination mit CO zu einer durch den Aktivator ausgelösten Konformationsänderung in der HNOX-Domäne der β_1 -Untereinheit, die eine domänenübergreifende Konformationsänderung in der Guanylat-Cyclase einleitet. Infolge der ungeklärten Bindungsstelle ist auch der Wirkmechanismus der NOsGC-Stimulatoren noch unklar. Zwar lässt sich auch aus den gemessenen Daten dieser Arbeit die Bindestelle der Stimulatoren nicht festlegen, aber die Tatsache, dass die Stimulatoren die gestörte intramolekulare Signaltransduktion über die coiled-coil Domäne eines mutierten Enzyms wieder herstellen können, gibt Anlass zu der Überlegung, dass sie auch im Wildtyp-Enzym zu einer verfeinerten und optimierten Signalweiterleitung über die α_1 PAS-Domäne und die coiled-coil Domäne führen. Dies steht auch im Einklang mit den Daten von Koglin und Behrends, die zeigten, dass die α_1 PAS-Domäne für die Aktivierung der NOsGC durch die Stimulatoren notwendig ist (Koglin und Behrends, 2003).

Im Gegensatz zur Bindungsstelle der NOsGC-Stimulatoren ist die Bindungsstelle des NOsGC-Aktivators Cinaciguat gut untersucht. Martin et al. veröffentlichten 2010 die Kristallstruktur der HNOX-Domäne von *Nostoc sp. PCC 7120* mit gebundenem Cinaciguat. Cinaciguat ersetzt in dieser Kristallstruktur die Häm-Gruppe und fungiert somit als Häm-Mimetikum. Die Carboxy-Seitenketten des Cinaciguat interagieren dabei ähnlich wie die Propionat-Seitenketten des Häms während sein

hydrophober Phenylring planar in die Hämtasche liegt. Durch die Bindung von Cinaciguat entfernt sich die α F-Helix der HNOX-Domäne von der Häm-Bindetasche (Martin et al., 2010). Diese wird im nicht stimulierten Zustand durch die kovalente Bindung mit dem H105 in ihrer Position gehalten. Die Bewegung der α F-Helix gibt das Aktivierungssignal in Richtung der katalytischen Domäne weiter (Martin et al., 2010).

Die Ergebnisse der direkten Fluoreszenzmessungen verdeutlichen, dass beide Wirkstoffgruppen, Stimulatoren und Aktivatoren, ebenso wie NO zu einer Konformationsänderung der katalytischen Domäne führen. Bei dem Vergleich der direkten Fluoreszenzmessungen mit den Enzymaktivitätsmessungen stellt sich heraus, dass eine stärkere Verformung der Substratbindetasche auch mit einer gesteigerten Aktivität einhergeht, denn die Verhältnisse in den Aktivitätsdaten stimmen mit denen der direkten Fluoreszenzmessungen überein (vergleiche Abbildung 30 mit Abbildung 35 für NO und Cinaciguat und Abbildung 34 mit Abbildung 27A für BAY 41-8543). Besonders zeigt sich dies beim Vergleich der Eigenfluoreszenzmessungen der α_1 S W466F / β_1 -Mutante mit den Aktivitätsdaten der α_1 S W466F / β_1 -Mutante. Der fehlende Anstieg der NO-stimulierten Mant-Eigenfluoreszenz der 466-defizienten Mutante belegt, dass durch den Austausch des W466 die Konformationsänderung der Substratbindetasche durch NO ausbleibt und die Aktivitätsdaten zeigen eine deutlich eingeschränkte cGMP-Produktion unter NO-Stimulation. Die Kombination von DEA/NO mit BAY 41-8543 regeneriert einerseits die cGMP-Produktion der α_1 S W466F / β_1 -Mutante und führt gleichzeitig auch zur Regeneration des Anstiegs der Eigenfluoreszenz der Mant-Gruppe. Die Daten der Eigenfluoreszenz unterstreichen damit die entscheidende Rolle des W466 und der α B-Helix der coiled-coil Domäne in der Signaltransduktion der NOsGC und geben einen Hinweis auf den Mechanismus des Regenerationseffekts der NOsGC-Stimulatoren.

Auch beim Vergleich der Eigenfluoreszenzmessungen mit den Aktivitätsdaten der hämfreien NOsGC in Anwesenheit des Aktivators Cinaciguat ergibt sich, dass eine stärkere Verformung der Substratbindetasche mit einer gesteigerten Aktivität einhergeht. Cinaciguat als Häm-Mimetikum führt dabei besonders in der hämfreien NOsGC zur Konformationsänderung der katalytischen Domäne und zu einem Anstieg der cGMP-Produktion. Dies steht im Einklang mit Studien, die belegen, dass die hämfreie NOsGC die Zielstruktur für Cinaciguat darstellt (Stasch et al., 2002c). Die Daten lassen demnach vermuten, dass die NOsGC-Aktivatoren die gleichen Signaltransduktionsmechanismen wie NO auslösen und unterstützen das oben beschriebene Zangenmodell der Aktivierung der NOsGC (vgl. Abbildung 61).

5.1.10. Untersuchungen der Signaltransduktion der α_2 / β_1 -Isoform der NOsGC

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Diplomarbeit angeleitet und betreut, bei der die Tryptophane der α_2 / β_1 -Isoform in Analogie zur α_1 / β_1 -Isoform mutiert und die FRET-Messungen und die Messungen der 2'-Mant-3'-dGTP Eigenfluoreszenz durchgeführt wurden (Lumpert, 2012).

Die α_2 / β_1 -Isoform der NOsGC (Ratte) enthält im Gegensatz zur α_1 / β_1 -Isoform nur vier Tryptophane. Auch hier wurde mit Enzym gearbeitet, welches mit dem Strep-tag II fusioniert und über eine Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Die Tryptophane der β_1 -Untereinheit W22 und W602 sind identisch, weil es sich um die gleiche Untereinheit handelt wie bei der α_1 / β_1 -Isoform. Die α_2 -Untereinheit enthält ein Tryptophan weniger als die α_1 -Untereinheit. Aus einem Sequenzvergleich ergibt sich, dass eines der verbleibenden zwei Tryptophane, W505, in einer analogen Position zum W466 in der coiled-coil Domäne liegt. In der HNOX-Domäne der α_2 -Untereinheit befindet sich das zweite Tryptophan (W36). Dies steht im Gegensatz zur nicht tryptophanhaltigen HNOX-Domäne α_1 -Untereinheit.

Die Ergebnisse der FRET-Messungen sprechen dafür, dass sich W505 der α_2 -Untereinheit, wie das homologe W466 der α_1 -Untereinheit, auf die Substratbindetasche zubewegt. Dies lässt einen ähnlichen Signaltransduktionsmechanismus der beiden Isoformen vermuten, wie er von den vergleichbaren enzymkinetischen Parametern und der ähnlichen Lage der Domänen zueinander angenommen werden kann (Haase et al., 2010c; Russwurm et al., 1998). Die Ergebnisse der Diplomarbeit ergaben, dass sich das in der HNOX der α_2 -Untereinheit befindliche W36 unter basalen Bedingungen in räumlicher Nähe zur katalytischen Domäne befindet und unterstützen damit das Modell der räumlichen Nähe des Amino-Terminus und des Carboxy-Terminus der NOsGC von Haase et al., 2010c. Die Eigenschaften des W22 und eine mögliche Rolle des W602 als Homo-FRET Akzeptor wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht und geben Anlass für weitere Untersuchungen der α_2 / β_1 Isoform mit dieser Methode. Außerdem ist es wünschenswert die Bewegung des W505 zum Beispiel mit Hilfe einer Mehrfachmutante genauer zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist auch das W36, das aufgrund seiner speziellen Lage Informationen über eine Funktion und Konformationsänderung des HNOX-Terminus der α -Untereinheiten geben könnte.

5.1.11. Ausblick

Die Bestimmung von FRET zwischen Tryptophanen als endogene FRET-Donatoren und 2'-Mant-3'-dGTP als FRET-Akzeptoren bietet die Möglichkeit, über die Daten der vorliegenden Arbeit hinaus zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus der NOsGC beizutragen. Denkbar wäre zum Beispiel ein Tryptophan in Analogie zur α_2 / β_1 -Isoform in die HNOX-Domäne der α_1 -Untereinheit einzufügen,

um deren Funktion und Konformationsänderungen zu untersuchen. Dabei müsste unter Umständen eine mögliche Fluoreszenzlöschung durch die Tryptophane der katalytischen Domäne berücksichtigt werden. Spannend ist auch die Frage, ob sich die coiled-coil Domäne der β_1 -Untereinheit in Analogie zur coiled-coil Domäne der α_1 -Untereinheit verschiebt. Dieser Aspekt könnte durch das Einfügen eines Tryptophans in die kurze Helix der coiled-coil Domäne der β_1 -Untereinheit an einer analogen Position zum W466 der α_1 -Untereinheit untersucht werden. Daraus könnten auch Rückschlüsse auf die Symmetrie der NOsGC gezogen werden. Weitere Untersuchungen mit dem NOsGC-Stimulator BAY 41-8543 in FRET-Experimenten könnte zum weiteren Verständnis des Aktivierungsmechanismus dieser Arzneistoffklasse beitragen. Die Entwicklung eines mit der Mant-Gruppe gekoppelten BAY 41-8543 könnte Aufschluss über die Bindestelle der NOsGC-Stimulatoren geben.

5.2. Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform

Parallel zu den Untersuchungen des molekularen Aktivierungsmechanismus der NOsGC wurde die besondere Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform untersucht. Diese ist im Gegensatz zur vornehmlich zytosolisch vorkommenden α_1 / β_1 -Isoform zum Teil an der Zellmembran lokalisiert. Die Erforschung der Voraussetzungen der membranären Lokalisation ist von besonderem Interesse für die Aufklärung der physiologischen Funktion der Isoform. Zusätzlich liefert sie die Grundlage für die Entwicklung von Fluoreszenzsensoren zur Gewinnung intrazellulärer, aktivitätsabhängiger Informationen.

Bellingham und Evans beschrieben 2007, dass die membranäre Lokalisation der α_2 / β_1 Isoform der NOsGC zu einer Kompartimentierung des gebildeten cGMP und damit zur sehr effizienten Weiterleitung des NO-Signals an membrangebundene Zielstrukturen führt (Bellingham und Evans, 2007). Die Autoren zeigten einerseits, dass durch diese Lokalisation die α_2 / β_1 -Isoform sensitiver für geringe Mengen an NO ist und wiesen andererseits nach, dass der Abbau des an der Membran produzierten cGMP durch Phosphodiesterasen im Vergleich zu dem im Zytosol produzierten cGMP vermindert ist. Eine Kompartimentierung eines sekundären Botenstoffes wurde für cAMP bereits beschrieben (Baillie, 2009). Die membranäre Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform konnte durch die Markierung eines Fusionsproteins aus einer α_2 und β_1 -Untereinheit mit dem Fluoreszenzprotein YFP und anschließender Untersuchung mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop näher charakterisiert werden. Haase zeigte mit dieser Methode, dass die α_2 / β_1 -Isoform nur dann an der Membran lokalisiert ist, wenn diese an eine Nachbarzelle grenzt und postulierte die Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten. Die intakte carboxy-terminale RETSL-Sequenz der α_2 -Untereinheit ist dafür zwingend erforderlich und die Lokalisation ist möglicherweise über eine PDZ-Domäne eines membranständigen Proteins vermittelt (Haase, 2010).

PDZ-Domänen vermitteln spezifische Interaktionen zwischen Proteinen besonders in Protein-Komplexen und interagieren zum Beispiel mit Transmembranrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und Proteinen des Zytoskeletts (Fanning und Anderson, 1999). Sie wurden nach den ersten Proteinen benannt in denen sie entdeckt wurden: dem *post synaptic density protein* (PSD95), dem *disc large* (DLG) und der *zona occludens* (ZO) (Hung und Sheng, 2002). Die 80-90 Aminosäuren großen PDZ-Domänen wechselwirken vor allem mit den carboxy-terminalen 5-7 Aminosäuren ihrer Bindungspartner, wobei insbesondere die terminale Carboxygruppe (COOH) für die Bindung entscheidend ist (Doyle et al., 1996; Hung und Sheng, 2002; Saras und Heldin, 1996). Die Interaktion der α_2 / β_1 -Isoform mit der PDZ-Domäne von PSD95, wie sie von Russwurm et al. beschrieben wurde, ist nach Haase vermutlich nicht für die besondere Lokalisation der Isoform an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich (Haase, 2010; Russwurm et al., 2001).

5.2.1. Dynamische Regulation der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform

Durch die Zugabe von zellmembrangängigem 8-Br-cGMP und die Aktivierung des Fusionskonstrukts mit NO steigt der cGMP-Spiegel in den Zellen. Dieser führt nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu dem Anstieg der Häufigkeit der fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte. Möglicherweise ist dieser Anstieg in den durchgeführten Versuchen geringer ausgeprägt, weil das endogene Interaktionsprotein, welches für die Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich ist, aufgrund der Überexpression der α_2 / β_1 -Isoform nicht in ausreichenden Mengen vorhanden ist, um alle Proteine an Zell-Zell-Kontakte zu rekrutieren. Der Effekt könnte demnach endogen stärker ausgeprägt sein. Die Ergebnisse weisen auf eine mögliche dynamische Regulation der Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform hin. cGMP bindet an unterschiedlichste Proteine in der Zelle, wie zum Beispiel an die PKG, an durch cyclische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle und an Phosphodiesterasen (Bender und Beavo, 2006; Craven und Zagotta, 2006). Demnach führt auch das cGMP Analogon 8-Br-cGMP zu unterschiedlichen Effekten in der Zelle und hat zum Beispiel Einfluss auf die PKG, die CaM Kinase II, auf Phosphodiesterasen und auf den Ca^{2+} -Spiegel in der Zelle (Kawaguchi und Hirano, 2013; Liu et al., 2007; Lohmann und Walter, 2005; Pöhler et al., 1995; Poppe et al., 2008).

Eine dynamische Regulation der Guanylat-Cyclasen über Phosphorylierungen ist bereits in der Literatur beschrieben. So wird zum Beispiel die GC-C an einem Serin im carboxy-terminalen Teil des Rezeptors durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert, wodurch die Cyclase-Aktivität gesteigert wird (Wada et al., 1996). Auch für die α_1 / β_1 -Isoform der NOsGC gibt es Veröffentlichungen, die von einer Phosphorylierung berichten. Die Phosphorylierung der α_1 / β_1 -Isoform durch die PKC bedingt zum Beispiel eine gesteigerte Guanylat-Cyclase-Aktivität (Louis et al., 1993; Zwiller et al., 1985). Die PKA erhöht die Aktivität der α_1 / β_1 -Isoform über eine Phosphorylierung der α_1 -Untereinheit in vivo (Zwiller et al., 1981). Diese Phosphorylierung findet möglicherweise an den Serinen 107 und / oder 108 der α_1 -Untereinheit statt und führt vermutlich zu einer erhöhten Effektivität von NO bei der Bindung an die NOsGC (Kostic et al., 2004). Eine Aktivierung der PKG I hingegen verringert die Aktivität der NOsGC und soll daher einen negativen Feedbackmechanismus der NOsGC-Aktivität darstellen (Ferrero et al., 2000; Murthy, 2001). Für die α_2 / β_1 -Isoform sind bisher noch keine Phosphorylierungen beschrieben. Die Membran-Lokalisation α_2 / β_1 -Isoform ist vermutlich nicht durch die Aktivität der NOsGC beeinflusst, da eine dominant negative Mutante des Fusionskonstrukts aus α_2 - und β_1 -Untereinheit ($\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{D568A}$) sowie eine nicht-Häm-haltige Mutante des Fusionskonstrukts ($\beta_1\text{H105AYFP}\alpha_2$) wie das Wildtyp-Enzym an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert sind. (Haase, 2010)

Da die PKG I endogen in HEK293-Zellen exprimiert wird und durch 8-Br-cGMP aktiviert wird, wäre eine Regulation der Lokalisation über die PKG I denkbar (Kwon et al., 2010; Pöhler et al., 1995). Daher wurde durch Austausch des Serins zu Glutaminsäure an zwei möglichen

Phosphorylierungsstellen der PKG I in der α_2 -Untereinheit eine Phosphomimese durchgeführt. Auf Grund des Befunds, dass der PKG-Aktivator 8-Br-cGMP die Anzahl der fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakte erhöht, hätten die Phosphomimesen die Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten theoretisch steigern sollen. Die Serin-Mutante der Bindesequenz in der amino-terminalen Domäne von α_2 (YFP α_2 S7E / β_1 CFP) wies jedoch genau so viele fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte auf wie das Wildtyp-Heterodimer. Diese potentielle Phosphorylierungsstelle wird demnach entweder nicht von der PKG I erkannt, oder ist nicht an der Regulation der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation beteiligt. Die Mutation der potentiellen Phosphorylierungsstelle in der katalytischen Domäne (YFP α_2 S717E / β_1 CFP) führte entgegen den Erwartungen zu einer signifikant verringerten Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten. Eine Regulation durch die PKG I über diese Sequenz ist demnach ebenfalls unwahrscheinlich. Der Abfall des Anteils an Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten könnte durch eine ungünstige Veränderung und Lage der RETSL-Sequenz bedingt sein. Denkbar wäre auch die Verhinderung der Bindung des an den Zell-Zell-Kontakten befindlichen Proteins durch Zerstörung der Bindesequenz, denn die eingeführte Mutation liegt in dem stark konservierten Bereich kurz vor der RETSL-Sequenz. Dieser könnte möglicherweise selbst in die Bindung involviert sein. Da nach den Daten beide spezifisch in der α_2 -Untereinheit vorkommenden potentiellen Phosphorylierungsstellen nicht an der Regulation der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation beteiligt sind, sollte eine Untersuchung der dritten bisher nicht berücksichtigten potentiellen Phosphorylierungsstelle in Erwägung gezogen werden. Diese kommt außer in der α_2 -Untereinheit auch in der α_1 -Untereinheit vor (siehe Abbildung 42).

Als weiterer möglicher Kandidat für eine dynamische Regulation der Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform wurde die CaMKII untersucht. Diese wird wie die PKG in HEK293-Zellen exprimiert und durch 8-Br-cGMP beeinflusst (siehe unten) (Li et al., 2012). Die CaMKII ist eine Serin/Threonin Kinase und wird besonders im Hippocampus, im Cortex und im Striatum exprimiert (Erondy und Kennedy, 1985). Sie ist unter anderem an der Langzeitpotenzierung und der Langzeitdepression der Gedächtnisfunktion beteiligt (Kawaguchi und Hirano, 2013; Lisman et al., 2002). Die präsynaptische Injektion eines CaMKII Inhibitorpeptids blockierte die Langzeitpotenzierung an Synapsen und morphologische Veränderungen, die durch NO-Donatoren und cGMP-Analoga ausgelöst werden (Ninan und Arancio, 2004). Diese und weitere Ergebnisse lassen vermuten, dass die CaMKII präsynaptisch dem NO / cGMP Signalweg nachgeschaltet ist und für die synaptische Plastizität entscheidend ist (Liu et al., 2007; Ninan und Arancio, 2004). Eine Regulation der Lokalisation der α_2 / β_1 Isoform ist demnach denkbar. Für die α_1 / β_1 -Isoform der NOsGC gibt es Hinweise auf eine Regulation der Lokalisation in Kardiomyocyten durch die CaMKII (Agullo et al., 2005). Die Inkubation von Kardiomyocyten mit dem Ca^{2+} Ionophor A23187 führte zu einer Translokation der α_1 / β_1 Isoform an die Zellmembran und zu einer verstärkten Synthese von cGMP durch NO-Stimulation. Diese Effekte wurden durch den unspezifischen Proteinkinase Inhibitor Staurosporin und den spezifischen CaMK Inhibitor KN-93

verstärkt. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration die intrazelluläre Verteilung der NOsGC reguliert und dass sie zu einer unterschiedlichen Regulation der Aktivität der NOsGC an der Membran oder im Zytosol führt (Agullo et al., 2005). Eine Ca^{2+} -abhängige Lokalisation der α_1 / β_1 -Isoform an der Zellmembran von Thrombozyten, die mit einer gesteigerten NO-Sensitivität einhergeht, wurde von Zabel et al. beschrieben (Zabel et al., 2002).

cGMP und auch 8-Br-cGMP führen durch die Aktivierung der PKG zu einer verringerten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Felbel et al., 1988; Ruth et al., 1993). Die verringerte Ca^{2+} -Konzentration könnte einen hemmenden Effekt auf die Aktivität der CaMKII haben. Andererseits konnte gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung der PKG zu einem Anstieg der CaMKII-Aktivität kommt (Kawaguchi und Hirano, 2013; Liu et al., 2007; Ninan und Arancio, 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Daten deuten nicht darauf hin, dass die CaMKII an einer Regulation der Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform beteiligt ist, weil die Phosphomimese und die Verhinderung der Phosphorylierung beide zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation führten. Die Verhinderung der Zell-Zell-Kontakt Lokalisation der Mutante der Erkennungssequenz YFP α_2 QLRETSL lässt vermuten, dass möglicherweise nicht nur die letzten fünf Aminosäuren für die Interaktion mit dem noch unbekannten Protein verantwortlich sind, sondern auch die -5 und -6 Position eine Rolle spielen. Zhang et al. beschrieben, dass diese Positionen bei der Bindung an die PDZ-Domänen verschiedener Proteine beteiligt sind (Zhang et al., 2006). Die Ergebnisse sprechen für eine spezifische Erkennung der FLRETSL-Sequenz und damit den letzten 7 carboxy-terminalen Aminosäuren der α_2 -Untereinheit.

Neben der Phosphorylierung von Serinen / Threoninen durch Proteinkinasen könnte auch eine Phosphorylierung von Tyrosinen an der Regulation der Lokalisation beteiligt sein. Meurer et al. konnten zeigen, dass H_2O_2 und Pervanadat zu einer Phosphorylierung des Tyrosins 192 der β_1 -Untereinheit führen (Meurer et al., 2005). Dieses phosphorylierte Tyrosin 192 bildet eine Bindungsstelle für SH2-Domänen und rekrutiert die Tyrosinkinase Src und Fyn an die NOsGC β_1 -Untereinheit der α_1 / β_1 -Isoform. Dies weist auf eine Verbindung zwischen dem NO / cGMP-Signalweg und Tyrosin-Kinase Signalwegen hin. In einer kürzlich erschienen Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Tyrosins 192 der β_1 -Untereinheit durch FYN, einer Tyrosin-Kinase aus der Src-Familie, vermittelt wird und der Komplex aus FYN und β_1 in Abhängigkeit von SEMA3A (secreted axon guidance molecule semaphorin-3A) an die Plasmamembran transloziert. In GABAergen Interneuronen ist dieser Komplex an der Verzweigung von Axonen beteiligt (Cioni et al., 2013). Eine Phosphorylierung der α_2 / β_1 -Isoform an der β_1 -Untereinheit über diese Tyrosinkinase könnte demnach auch für die Regulation der Lokalisation dieser Isoform an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich sein. In wie weit diese Hypothese zutrifft ist weitergehenden Untersuchungen vorbehalten.

5.2.2. Interaktion mit dem Polaritätsprotein Scribble

Es gibt unterschiedliche Arten von Zell-Zell-Kontakten, wie zum Beispiel besonders dichte Verbindungsstrukturen (engl. „tight junctions“) an der apikalen Seite der basolateralen Zellmembran oder Adhäsionsverbindungen (engl. „adherens junctions“), welche direkt neben den dichten Verbindungsstrukturen in der basolateralen Zellmembran liegen (Miyoshi und Takai, 2005; Nagafuchi, 2001). Adhäsionsverbindungen vermitteln die Adhäsion zweier Zellen, während die dichten Verbindungsstrukturen die apikobasale Polarität und die Regulation der Diffusion durch die Zell-Verbindung vermitteln. Adhäsionsverbindungen bestehen aus integralen Membranproteinen der Cadherin-Familie, welche mit Cadherinen der Nachbarzelle interagieren, und den zytosolischen Proteinen α , β , γ -Cateninen, welche die Cadherine mit dem Zytoskelett verbinden. Außerdem binden weitere zytosolische Proteine an den Cadherin-Catenin-Komplex, von denen viele PDZ-Domänen enthalten (Nagafuchi, 2001). Zu diesen gehört auch Scribble, welches in Neuronen und Epithelzellen exprimiert wird und unter anderem an der basolateralen Membran und an Adhäsionsverbindungen lokalisiert ist (Nakagawa et al., 2004; Navarro et al., 2005). Scribble weist insgesamt vier PDZ-Domänen auf, die für Interaktionen mit verschiedenen Proteinen verantwortlich sind (zum Beispiel β -Catenin (Sun et al., 2009), MCC (Fukuyama et al., 2008), LPP (Petit et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Interaktion zwischen der überexprimierten α_2 / β_1 -Isoform der NOGC und des überexprimierten Scribble stattfindet. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die Interaktion der beiden Proteine über die Bindung der RETSL Sequenz der α_2 -Untereinheit an die PDZ 3 Domäne von Scribble vermittelt sein könnte (Arnaud et al., 2009; Zhang et al., 2006): Aus einem zufälligen Phagen-Pool wurden Peptide auf die Bindung an die PDZ Domänen 1 und 3 von Scribble untersucht. Dabei wurden mehrere Proteine mit einer RETSL-Sequenz als Bindungspartner für die PDZ 3 von Scribble gefunden von denen eines sogar den letzten sieben Aminosäuren der α_2 -Untereinheit entsprach: FLRETSL. Auch für die PDZ 1 Domäne konnten einige Proteine mit einer RETSL-Sequenz als Bindungspartner identifiziert werden (Zhang et al., 2006). Die allgemeine Erkennungssequenz für die PDZ 3-Domäne von Scribble ist in Abbildung 63 dargestellt.

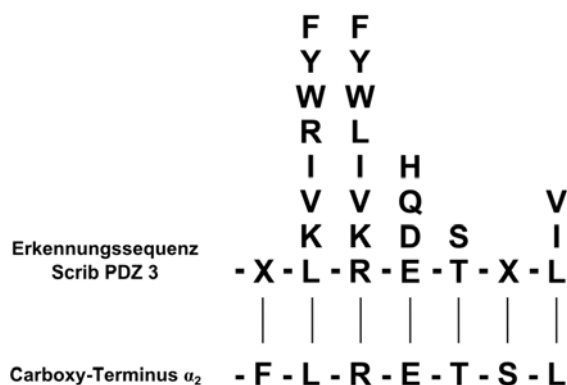


Abbildung 63: Erkennungssequenz der PDZ 3 Domäne von Scribble im Vergleich zur carboxy-terminalen RETSL-Sequenz von α_2
Nach Zhang et al., 2006. Die carboxy-terminalen sieben Aminosäuren der α_2 -Untereinheit entsprechen der Erkennungssequenz der PDZ 3-Domäne von Scribble. X = beliebige Aminosäure.

Das Protein „mutated in colorectal cancer“ (MCC) weist eine Carboxy-terminale ETSL-Sequenz auf und es konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch dieses mit der PDZ 3 Domäne von Scribble interagiert (Arnaud et al., 2009).

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit findet zwar eine Interaktion zwischen α_2 / β_1 und Scribble nach Überexpression statt, diese ist vermutlich jedoch nicht für die Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich. Einerseits tritt die Zell-Zell-Kontakt Lokalisation der Isoform auch in PC12-Zellen auf, die nicht detektierbare Mengen von Scribble enthalten, und andererseits steigt die Anzahl an fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten bei Koexpression von Scribble und $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ nicht an. Haase zeigte außerdem, dass Scribble in HEK293-Zellen unabhängig von Zell-Zell-Kontakten an der Membran lokalisiert ist und dass bei Koexpression beider Proteine $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ weiterhin an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist. Die Interaktion von Scribble mit α_2 / β_1 scheint daher eine andere Bedeutung zu haben.

Scribble ist ein Regulator der apikal-basolateralen Zellpolarität und wurde in Drosophila auf der Suche nach tumorfördernden Mutationen identifiziert. Ein Verlust von Scribble führt zu einem tumorartigen Wachstum und unterstützt in Kombination mit Ras, Raf oder Notch die Invasion und Metastasierung (Bilder et al., 2000; Brumby und Richardson, 2003; Dow et al., 2008). Dem in Säugetieren vorkommenden Homolog von Scribble wird eine Tumorsuppressor Aktivität zugeschrieben und die Herabregulation seiner Expression wird mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Dow et al., 2003; Pearson et al., 2011; Thomas et al., 2005). Diese Aktivität als Tumorsuppressor beruht auf der Regulation der Morphogenese von Epithelzellen, der Regulation der Apoptose und der Deregulation des Mitogen-aktivierte Proteinkinase Signalwegs (Dow et al., 2008; Pearson et al., 2011; Zhan et al., 2008). Die Interaktion von Scribble und α_2 / β_1 könnte daher möglicherweise mit den Tumorsuppressor Eigenschaften von Scribble zusammenhängen. So gibt es zum Beispiel Hinweise darauf, dass Mutationen der α_2 -Untereinheit mit der Entstehung von Kolonkarzinomen und Mammakarzinomen in Verbindung stehen (Sjoblom et al., 2006; Wood et al., 2007).

Welches Protein für die Rekrutierung der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakte verantwortlich ist muss weiterhin untersucht werden. Russwurm et al. beschrieben eine Interaktion der α_2 / β_1 -Isoform mit PSD95, ein in der PSD („post synaptic density“) von Neuronen vorkommendes Protein, welches auch an der Langzeitpotenzierung beteiligt ist (Russwurm et al., 2001; Zheng et al., 2011). Außer der α_2 / β_1 -Isoform interagiert auch die neuronale NOS mit PSD95 über ihre carboxy-terminale PDZ-Bindesequenz (Brenman et al., 1996). Dies lässt auf eine funktionelle Bedeutung dieser Interaktion schließen. Allerdings zeigten Versuche von Haase, dass PSD95 (SAP90) und das Analog aus Drosophila (DLG) in HEK293-Zellen keine Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten aufweisen. Haase schloss daher, dass die Interaktion von PSD95 mit der α_2 -Untereinheit nicht für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation verantwortlich ist (Haase, 2010).

Neben der Interaktion der α_2 -Untereinheit mit PSD95 wurde auch bereits eine Interaktion der entsprechenden FLRETSL-Sequenz mit Syntrophin nachgewiesen, ein mit dem Gerüstprotein Dystrophin assoziiertes Protein (Castello et al., 1996; Hoffmüller et al., 1999). Diese Interaktion ist über die PDZ-Domäne von Syntrophin vermittelt (Adams et al., 1995; Hoffmüller et al., 1999). Die Autoren vermuten eine funktionelle Bedeutung dieser Interaktion, da auch die neuronale NOS mit Syntrophin interagiert (Brenman et al., 1996) und diese sowie die PKG I an der neuromuskulären Endplatte nachgewiesen wurden (Chao et al., 1997). Die räumliche Nähe und dadurch bedingte höhere lokale Konzentration von NOS, NOsGC und PKG I würde eine effizientere Weiterleitung des Signals ermöglichen. Da Syntrophin über die Interaktion mit Dystrophin an der Zellmembran lokalisiert ist, ist es ein möglicher Interaktionspartner für die Rekrutierung der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakte (Michalak und Opas, 1997).

Weitere Proteine, die für die Lokalisation der α_2 -Untereinheit an der Membran verantwortlich sein könnten sind: β -Catenin, da es über Cadherine gebunden an Adhäsionsverbindungen vorliegt und seine Konzentration in HEK293-Zellen bei Inkubation mit 8-Br-cGMP ansteigt (Kwon et al., 2010); Cadherine, besonders N-Cadherin, das im Gegensatz zu E-Cadherin in HEK293-Zellen vorkommt (Hogan et al., 2004); LIN-7 (Veli), weil es über eine PDZ-Domäne verfügt und mit β -Catenin an Zell-Zell-Kontakten interagiert (Butz et al., 1998; Perego et al., 2000).

5.3. NOsGC als Fluoreszenzsensor

Die Entwicklung eines Fluoreszenzsensors für NO ist ein hilfreicher Baustein für die Aufklärung der zahlreichen physiologischen Funktionen der NOsGC als zentrales Enzym des NO / cGMP-Signalwegs. Das Verständnis des molekularen Aktivierungsmechanismus der NOsGC, ihrer dynamischen Regulation und Lokalisation erleichtert die Entwicklung dieser Sensoren.

5.3.1. Funktionsweise des NOsGC Fluoreszenzsensors

Die Grundidee für die Nutzung des cGMP-Sensors FlnG zur Entwicklung eines Fluoreszenzsensors zur Detektion der intrazellulären NOsGC-Aktivität basiert auf der direkten und lokalen Detektion des von der NOsGC produzierten cGMP. Dabei soll das durch NO-Stimulation der NOsGC entstandene cGMP unmittelbar an den cGMP-Sensor FlnG binden und zu einer Konformationsänderung und dem damit verbundenen Intensitätsanstieg der Fluoreszenz des cpEGFP führen.

Das Prinzip der NO-Detektion anhand des direkten und lokalen Nachweises des von der NOsGC gebildeten cGMP wurde von Sato et al. mit dem NO-Sensor NOA-1 eingeführt. Die Autoren fusionierten die beiden Untereinheiten der NOsGC, α_1 und β_1 , jeweils mit dem FRET-basierten cGMP-Sensor CGY-Del1 (Sato et al., 2005). Der Nachteil dieses NO-Sensors ist, dass zunächst eine Dimerisierung der beiden Untereinheiten stattfinden muss, damit ein cGMP-produzierendes Heterodimer entsteht. Da es vermutlich intrazellulär nicht zu einer vollständigen Dimerisierung der Untereinheiten kommt, ist nur ein Anteil des Sensors aktiv. Die Signale des Sensors sind daher möglicherweise nicht so ausgeprägt, wie beim Vorliegen einer vollständigen Heterodimerisierung. Der Einfluss der Heterodimerisierung kann mit einem monomolekularen Sensor umgangen werden. Dieses Prinzip ließ sich bestmöglich mit den entwickelten Fusionskonstrukten aus den beiden Untereinheiten der NOsGC von Haase et al. erreichen. Gleichzeitig gewährleisteten die Konstrukte eine NO-abhängige katalytische Aktivität der NOsGC (Haase et al., 2010a; Haase et al., 2010c). Um die räumliche Nähe und damit die direkte Detektion des gebildeten cGMP zu ermöglichen, wurden diese Konstrukte daher in der vorliegenden Arbeit mit dem α -FlnG fusioniert (Nausch et al., 2008).

Nausch et al. entwickelten drei verschiedene Varianten des cGMP-Sensors FlnG, die unterschiedliche K_d -Werte für cGMP und unterschiedlich stark ausgeprägte Fluoreszenzintensitätsanstiege aufwiesen (Nausch et al., 2008). Das in dieser Arbeit verwendete FlnG ist ein Derivat des von Nausch et al. entwickelten α -FlnG. Bei einer Anregung von α -FlnG mit 480 nm steigt die Intensität durch die Bindung von cGMP um das 1,5-fache im zellfreien System und um das 1,2-fache intrazellulär. Dabei liegt der EC_{50} -Wert für cGMP bei 35 nM (Nausch et al., 2008). Damit ist α -FlnG das sensitivste Konstrukt der FlnG-Varianten und eignet sich daher

besonders, um auch geringe Mengen von cGMP zu detektieren. Durch die Fusion des α -FlnG mit der NOsGC und durch die Transfektion des Konstrukts, sind die zu messenden cGMP-Spiegel jedoch vermutlich so hoch, dass diese besondere Sensitivität für den cGMP-Nachweis nicht entscheidend ist.

Bei den Versuchen von Haase et al. fiel auf, dass eine Fusion des Amino-Terminus der β_1 -Untereinheit mit einem Fluoreszenzprotein zu einem Verlust der Häm-Gruppe führt und eine Stimulation der Aktivität durch NO verhindert wird (Haase et al., 2010c). Aus diesem Grund wurde bei den neuen Konstrukten der Amino-Terminus der β_1 -Untereinheit unverändert belassen, sodass die β_1 -Untereinheit bei beiden Konstrukten amino-terminal lokalisiert ist. Als weitere Voraussetzung sollte für die α_2 / β_1 -Isoform die carboxy-terminale RETSL-Sequenz der α_2 -Untereinheit (siehe 5.2) als carboxy-terminale Endsequenz bestehen bleiben, um die Lokalisation der Isoform an Zell-Zell-Kontakten zu erhalten. Aufgrund dieser Vorbedingungen entstanden für die beiden Isoformen der NOsGC zwei unterschiedliche Konstrukte: In der α_1 / β_1 -Isoform befindet sich das FlnG carboxy-terminal, während sich das FlnG in der α_1 / β_1 -Isoform zwischen den beiden Untereinheiten der NOsGC befindet.

Überträgt man diese unterschiedlichen Arten der Fusion auf das anhand der FRET-Messungen mit 2'-Mant-3'-dGTP entwickelte Modell der NOsGC (Abbildung 61) lässt sich vermuten, dass sich in beiden Fusionskonstrukten das FlnG in räumlicher Nähe zur katalytischen Domäne und damit in der direkten Nähe zum Entstehungsort des cGMP befindet (Abbildung 64). Damit ist eine direkte Detektion des neu gebildeten cGMP sehr wahrscheinlich (vgl. Abbildung 64B und C). Zusätzlich wird ersichtlich, dass in dem Konstrukt der α_1 / β_1 -Isoform, in der FlnG nur über seinen Amino-Terminus an den Carboxy-Terminus der α_1 -Untereinheit gebunden ist, die Konformationsänderung und der damit verbundene Intensitätsanstieg des FlnG nur in Abhängigkeit von cGMP ausgelöst wird. Im Fusionskonstrukt β_1 FlnG α_2 hingegen ist der Amino-Terminus des FlnG an den Carboxy-Terminus der β_1 -Untereinheit gebunden und gleichzeitig ist der Carboxy-Terminus des FlnG an den Amino-Terminus der α_2 -Untereinheit gebunden. In dieser Konstellation ist es denkbar, dass auch die Konformationsänderungen der NOsGC einen direkten Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des FlnG haben. Die in dieser Arbeit gemessenen Daten sprechen allerdings gegen einen solchen Mechanismus, da sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen $\beta_1\alpha_1$ FlnG und β_1 FlnG α_2 zeigten.

Einen Einfluss auf die intrazelluläre Detektion der NOsGC-Aktivität mit den Fusionskonstrukten könnten Änderungen des cGMP-Spiegels haben, die durch membranständige Guanylat-Cyclasen und deren Liganden verursacht werden (siehe 1.4). Die Messung der Intensität des FlnG bei Perfusion mit DETA/NO zeigt aber, dass der cGMP-Spiegel in Abwesenheit der NOsGC-Sensorkonstrukte durch NO kaum beeinflusst wird (siehe 4.4.3). Einen weiteren Einfluss auf die Detektion des cGMP-Spiegels hat die Selektivität des FlnG für cGMP gegenüber cAMP. α -FlnG ist das selektivste der FlnG-Konstrukte mit einem Faktor der Selektivität für cGMP gegenüber cAMP von 1140 (Nausch et

al., 2008). Die beschriebenen Einflussfaktoren werden durch das Prinzip der lokalen und direkten Detektion des vom Sensor selbst produzierten cGMP verringert.

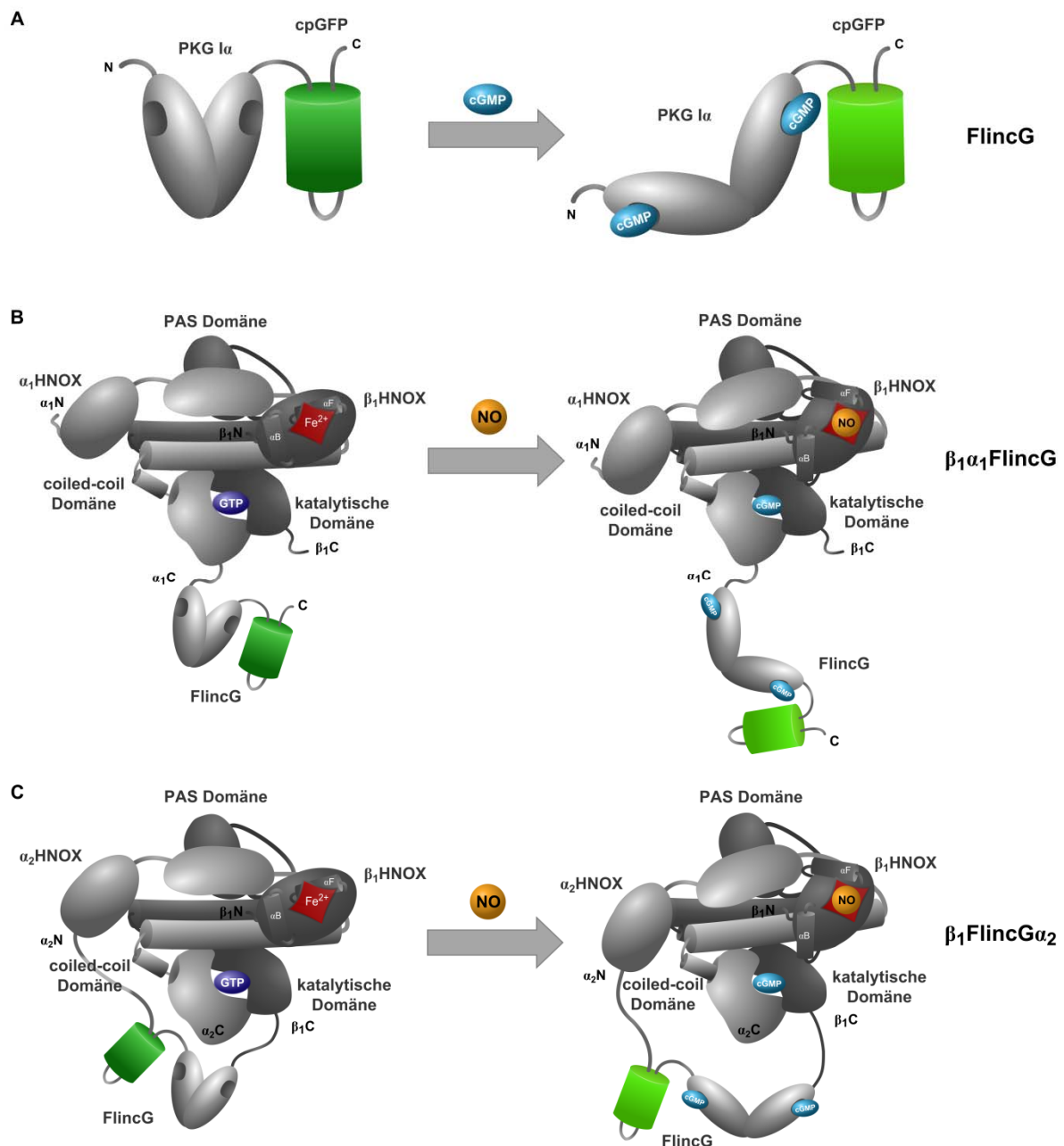


Abbildung 64: Modell der FlnG-Fusionskonstrukte

A Aktivierungsmechanismus und Konformationsänderung des FlnG bei der Bindung von cGMP nach Nausch et al., 2008. **B** Aktivierungsmechanismus des Fusionskonstrukts $\beta_1\alpha_1\text{FlnG}$ durch NO. Der Amino-Terminus des FlnG ist mit dem Carboxy-Terminus der α_1 -Untereinheit verbunden. **C** Aktivierungsmechanismus des $\beta_1\text{FlnG}\alpha_2$ durch NO. Amino- und Carboxy-Terminus des FlnG sind mit der Guanylat-Cyclase verbunden.

Auffällig war der starke Intensitätsanstieg des FlnG und der neuen Konstrukte nach dem Einschalten des Flusses des Mediums. Die PKG I wird endogen in HEK293-Zellen exprimiert (Kwon et al., 2010). Da α -FlnG die amino-terminalen Dimerisierungsregionen der PKG I enthält, kann es mit der endogenen PKG I interagieren und bildet mit dieser gemischte Dimere (Nausch et al., 2008). Diese

Interaktion könnte sich auf die Reportereigenschaften des FlnG auswirken. Eine mögliche Erklärung für den starken Intensitätsanstieg könnte eine oxidative Aktivierung der PKG I α durch die Scherbeanspruchung und den dadurch ausgelösten oxidativen Stress der Zellen sein. Neben dem klassischen NO / cGMP Signalweg kann die PKG I α auch über einen oxidativen Mechanismus, bei dem eine Disulfidbrücke zwischen den Untereinheiten von Homodimeren entsteht, aktiviert werden. Die Disulfidbrückenbildung wird dabei über das Cystein 42 vermittelt (Burgoyne et al., 2007; Burgoyne et al., 2012; Rudyk et al., 2012). Dieses Cystein ist in dem in dieser Arbeit verwendeten α -FlnG Derivat vorhanden, sodass eine oxidative Disulfidbrückenbildung und die damit verbundene Aktivierung realistisch erscheinen. Um diese Hypothese zu überprüfen und den Effekt zu verhindern könnte entweder anstelle eines Derivates von α -FlnG das ebenfalls von Nausch et al. entwickelte δ -FlnG verwendet werden (Nausch et al., 2008). Diesem fehlen die ersten 77 Aminosäuren der PKG und somit auch das redox-sensitive Cystein 42. Außerdem ist δ -FlnG wenig sensitiv gegenüber Umgebungseinflüssen, wie dem pH-Wert, und zeigt hohe cGMP Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten. Aufgrund dieser Eigenschaften ermöglicht δ -FlnG die sehr sensitive intrazelluläre Bestimmung sich schnell ändernder cGMP-Spiegel (Nausch et al., 2008). Allerdings ist sein K_d -Wert gegenüber cGMP etwas höher als der des α -FlnG (170 nM gegenüber 35 nM). Eine andere Möglichkeit die oxidative Aktivierung der PKG I α zu verhindern ohne die höhere Sensitivität des α -FlnG zu verlieren, wäre daher die Mutation des Cysteins 42 zu Serin (Burgoyne et al., 2007). Sollte eine Dimerisierung und die Bildung von Disulfidbrücken für den starken Anstieg der FlnG-Fusionskonstrukte nach Einschalten des Flusses verantwortlich sein, dürfte weder δ -FlnG noch eine Cystein 42-Mutante der Konstrukte einen solchen Anstieg zeigen.

5.3.2. Nutzung des NOsGC-Fluoreszenzsensors

Mit Hilfe des NOsGC-Fluoreszenzsensors kann nicht nur die NO-stimulierte Aktivität der NOsGC detektiert werden, sondern auch die intrazellulären Effekte von NOsGC-Aktivatoren, wie zum Beispiel Cinaciguat. Das Ausmaß des Intensitätsanstiegs unter Cinaciguat im Vergleich zum Intensitätsanstieg durch DETA/NO spiegelt die Verhältnisse aus den Aktivitätsmessungen in der zytosolischen Fraktion und des gereinigten Proteins wider. DETA/NO führt zu einem stärkeren Intensitätsanstieg des NOsGC-Fluoreszenzsensors und einem stärkeren Anstieg der cGMP-Produktion als Cinaciguat. Das bedeutet gleichzeitig, dass bei allen drei NOsGC-Proben (gereinigt, im Zytosol, in der Zelle) ein Anteil hämfreier und/oder oxidierter NOsGC enthalten ist, denn Cinaciguat aktiviert in Konzentrationen unter 100 μ M nur die hämfreie NOsGC (Roy et al., 2008; Schmidt et al., 2004; Stasch et al., 2002c). Die Messungen ergaben weiterhin, dass Cinaciguat einen steileren Intensitätsanstieg des Fluoreszenzsensors $\beta_1\alpha_1$ FlnG verursachte als DETA/NO und sein Plateau

früher als dieses erreichte. Eine zeitabhängige Messung in Thrombozyten, bei der nach der Aktivierung der endogenen NOsGC durch Cinaciguat zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen wurden, ergaben jedoch einen gegenteiligen Effekt (Roy et al., 2008). Hier führte Cinaciguat (10 μ M) nur zu einem vergleichsweise langsamen Anstieg des cGMP-Spiegels (2 Minuten) während es unter NO zu einem sehr schnellen Anstieg (20 Sekunden) kam. In diesen Messungen wurde allerdings Spermin NONOat als NO-Donor eingesetzt. Dieses weist eine Halbwertszeit von nur 37 Minuten auf (Ferrero et al., 1999). Der langsamere Anstieg der Intensität von $\beta_1\alpha_1$ FlnG (8 Minuten bis zum Erreichen des Plateaus) könnte in der langsamen Freisetzungskinetik und geringeren erreichten NO-Konzentration des DETA/NO begründet sein (Halbwertszeit: 20 Stunden). Die Dauer bis zum Erreichen des durch Cinaciguat-induzierten Anstiegs (Konzentration Cinaciguat 10 μ M) war in den durchgeführten Messungen ca. 1 Minute und lag dementsprechend in einem ähnlichen Bereich wie bei den durch Roy et al. durchgeführten Messungen (Roy et al., 2008). Dies zeigt, dass mit Hilfe des Fluoreszenzensors $\beta_1\alpha_1$ FlnG Untersuchungen zur intrazellulären Aktivierung der NOsGC durch neue Arzneistoffe durchgeführt und Erkenntnisse über deren Zellmembrangängigkeit und Aktivierungs-Geschwindigkeit gewonnen werden können.

Die Untersuchungen des Fluoreszenzensors β_1 FlnG α_2 zeigen, dass dieser wie die α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten liegt und für die Messung der lokalisationsbezogenen Aktivität der NOsGC-Isoform genutzt werden kann. Bei einer geringeren Überexpression des Konstrukts β_1 FlnG α_2 befindet sich dieses hauptsächlich an Zell-Zell-Kontakten. Diese Verteilung stellt wahrscheinlich die endogene Verteilung der α_2 / β_1 Isoform besser dar als stärker überexprimierte Zellen. Bei der Perfusion der Zellen mit DETA/NO war der prozentuale Intensitätsanstieg des Konstrukts an den Zell-Zell-Kontakten signifikant höher als der prozentuale Intensitätsanstieg im Zytosol. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die besondere Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten NO an der Membran abgefangen wird und es so zu einer lokal erhöhten cGMP-Konzentration an Zell-Zell-Kontakten kommt.

Bellingham und Evans zeigten, dass die membranäre Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform zu einer Kompartimentierung des gebildeten cGMP und damit zur sehr effizienten Weiterleitung des NO-Signals an membrangebundene Zielstrukturen führt (Bellingham und Evans, 2007). Die Kompartimentierung ist nach Bellingham und Evans auf eine lokalisationsbezogen ausgeprägte Aktivität der PDE, insbesondere der PDE5, zurückzuführen. Die PDE-Aktivität ist nach ihren Daten im Zytosol besonders hoch, an der Membran dagegen ist sie niedrig. Dies bedingt hohe cGMP-Konzentrationen an der Zellmembran und geringere cGMP-Konzentrationen im Zytosol. Der Einsatz von PDE-Hemmern ermöglichte es Bellingham und Evans die Kompartimentierung des cGMP zu detektieren. In Abwesenheit eines PDE-Hemmers wurde die Nachweisgrenze für cGMP zum Teil nicht überschritten (Bellingham und Evans, 2007). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden

Arbeit der PDE5-spezifische PDE-Hemmer Zaprinast für die Messungen des Fluoreszenzensors $\beta_1\text{FlnG}\alpha_2$ eingesetzt. Dieser erleichterte die Detektion des von der α_2 / β_1 Isoform produzierten cGMP mittels FlnG. Nach Bellingham und Evans müsste sich die Anwesenheit eines PDE-Hemmers stärker im Zytosol als an der Membran auswirken und daher zu einem verstärkten Intensitätsanstieg des Fluoreszenzensors im Zytosol führen. In den durchgeführten Messungen stieg die Intensität des $\beta_1\text{FlnG}\alpha_2$ in Anwesenheit des PDE-Hemmers an der Membran jedoch stärker an als im Zytosol. Dies deutet darauf hin, dass die Differenz des Intensitätsanstiegs zwischen Zytosol und Membran in Abwesenheit eines PDE-Hemmers möglicherweise noch stärker ausgeprägt ist. Die Ergebnisse von Bellingham und Evans werden durch die Daten nicht in Frage gestellt, da der zytosolische Anteil des Sensors einer geringeren Menge von NO ausgesetzt ist als der membranständige Sensoranteil. Dadurch wird im Zytosol weniger cGMP gebildet, das durch die PDE abgebaut werden kann, sodass der Einfluss des PDE-Hemmers geringer ausfällt als erwartet.

Die besondere Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten dient möglicherweise der Kommunikation zwischen zwei Zellen. Das Abfangen des NO an der Zellmembran würde einerseits eine möglichst kurze Diffusionsstrecke des NO ermöglichen, und andererseits mögliche unspezifische Wechselwirkungen des NO mit anderen Proteinen im Zytosol der Zielzelle, wie die Bindung an Amino- und Thiol-Gruppen und die Reaktion mit Übergangsmetallen, ungesättigten Fettsäuren, Sauerstoff und Superoxiden, verhindern (Pfeiffer, 1999). Bei einigen dieser Reaktionen wird NO zu Nitrit oder Nitrat oxidiert und sein Effekt als Signalmolekül damit verhindert.

5.3.3. Ausblick

Die aus den FRET-Messungen mit 2'-Mant-3'-dGTP gewonnenen Erkenntnisse über die Konformationsänderungen der NOsGC geben Hinweise für die Entwicklung eines neuen, cGMP-unabhängigen Fluoreszenzensors der NOsGC. Zum Beispiel wäre die direkte Verknüpfung des α -HNOX-Terminus mit dem Carboxy-Terminus der β_1 -Untereinheit über cpEGFP ($\beta_1\text{cpEGFP}\alpha_1$ bzw. $\beta_1\text{cpEGFP}\alpha_2$) ebenso denkbar wie ein Konstrukt, in dem die katalytische Domäne der α_1 -Untereinheit in dem Fusionskonstrukt durch cpEGFP ersetzt ist ($\beta_1\alpha_1\Delta\text{KAT}$ -cpEGFP). So könnte möglicherweise die Bewegung des W466 der coiled-coil Domäne der α_1 -Untereinheit als Sensor für die Aktivität der NOsGC genutzt werden. Der Vorteil dieser Sensoren gegenüber bestehenden wäre eine cGMP-unabhängige Bestimmung der intrazellulären NO-Konzentration und Verteilung mit der sehr hohen Selektivität und Sensitivität der HNOX-Domäne der NOsGC für NO.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der NO / cGMP-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und der Relaxation der glatten Muskulatur, bei der Thrombozytenaggregation und bei der zentralen und peripheren Neurotransmission. Das zentrale Enzym dieses Signalwegs ist die Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylat-Cyclase (NOsGC).

Wie das durch NO ausgelöste Aktivierungssignal vom Amino-Terminus der β_1 -Untereinheit auf die katalytische Domäne im Carboxy-Terminus übertragen wird, war bisher unklar. Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung der dynamischen Konformationsänderungen der NOsGC bei NO-Stimulation unter Verwendung der endogenen Tryptophane als FRET-Donatoren und dem Substratanalogon 2'-Mant-3'-dGTP als FRET-Akzeptor. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das NO-Aktivierungssignal von der HNOX-Domäne über zwei unterschiedliche Domänen auf die katalytische Domäne übertragen wird. Die Bewegungen von Helices aus diesen beiden Domänen in Richtung der katalytischen Domäne führen dazu, dass sich diese schließt und in ihre aktive Konformation übergeht. Zusätzlich zeigen die Messungen der Enzymaktivität, dass die NOsGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 eine gestörte intramolekulare Signalweiterleitung wieder herstellen können.

Das Polaritätsprotein Scribble wurde als möglicher Interaktionspartner der α_2 -Untereinheit identifiziert, ist jedoch nach den Daten der Arbeit nicht für die Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten verantwortlich. Weitere Untersuchungen ergaben, dass nur das Heterodimer aus α_2 - und β_1 -Untereinheit an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, während die einzelne α_2 -Untereinheit zytosolisch verteilt ist. Außerdem zeigen die Daten, dass die Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform einer dynamischen Regulation durch den cGMP-Spiegel in der Zelle unterliegt.

Um die intrazelluläre und lokalisationsbezogene Aktivität der NOsGC untersuchen zu können, wurden auf Basis des cGMP-Fluoreszenzindikators FlincG und den beiden Isoformen der NOsGC zwei monomolekulare Fluoreszenzsensoren charakterisiert. Der Einsatz des Fluoreszenzsensors β_1 FlincG α_2 führte zu der Beobachtung, dass durch die besondere Lokalisation der α_2 / β_1 -Isoform an Zell-Zell-Kontakten NO an der Membran abgefangen wird und dieses zu einer lokal erhöhten cGMP-Produktion führt. Untersuchungen mit dem zytosolischen Fluoreszenzsensor $\beta_1\alpha_1$ FlincG und dem NOsGC-Aktivator Cinaciguat zeigen, dass Cinaciguat einen schnellen Anstieg der intrazellulären NOsGC-Aktivität verursacht.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M.E., Dwyer, T.M., Dowler, L.L., White, R.A., and Froehner, S.C. (1995). Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain. *J Biol Chem* 270, 25859-25865.
- Agullo, L., Garcia-Dorado, D., Escalona, N., Ruiz-Meana, M., Mirabet, M., Inserte, J., and Soler-Soler, J. (2005). Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 68, 65-74.
- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., and Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 273, 32950-32956.
- Allerston, C.K., von Delft, F., and Gileadi, O. (2013). Crystal structures of the catalytic domain of human soluble guanylate cyclase. *PLoS One* 8, e57644.
- Ammendola, A., Geiselhöringer, A., Hofmann, F., and Schlossmann, J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta. *J Biol Chem* 276, 24153-24159.
- Anantharaman, V., Balaji, S., and Aravind, L. (2006). The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol Direct* 1, 25.
- Arnaud, C., Sebbagh, M., Nola, S., Audebert, S., Bidaut, G., Hermant, A., Gayet, O., Dusetti, N.J., Ollendorff, V., Santoni, M.J., *et al.* (2009). MCC, a new interacting protein for Scrib, is required for cell migration in epithelial cells. *FEBS Lett* 583, 2326-2332.
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3203-3207.
- Bacskaï, B.J., Skoch, J., Hickey, G.A., Allen, R., and Hyman, B.T. (2003). Fluorescence resonance energy transfer determinations using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy to characterize amyloid-beta plaques. *J Biomed Opt* 8, 368-375.
- Bagdy, G., Riba, P., Kecskemeti, V., Chase, D., and Juhasz, G. (2010). Headache-type adverse effects of NO donors: vasodilation and beyond. *Br J Pharmacol* 160, 20-35.
- Baillie, G.S. (2009). Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J* 276, 1790-1799.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11241-11246.
- Barrientes, S., Cooke, C., and Goodrich, D.W. (2000). Glutamic acid mutagenesis of retinoblastoma protein phosphorylation sites has diverse effects on function. *Oncogene* 19, 562-570.
- Baskaran, P., Heckler, E.J., van den Akker, F., and Beuve, A. (2011a). Aspartate 102 in the heme domain of soluble guanylyl cyclase has a key role in NO activation. *Biochemistry* 50, 4291-4297.
- Baskaran, P., Heckler, E.J., van den Akker, F., and Beuve, A. (2011b). Identification of Residues in the Heme Domain of Soluble Guanylyl Cyclase that are Important for Basal and Stimulated Catalytic Activity. *PLoS One* 6, e26976.

- Bellingham, M., and Evans, T.J. (2007). The $\alpha 2\beta 1$ isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling. *Cell Signal* 19, 2183-2193.
- Bender, A.T., and Beavo, J.A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58, 488-520.
- Bilder, D., Li, M., and Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289, 113-116.
- Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403, 676-680.
- Boehning, D., and Snyder, S.H. (2003). Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 26, 105-131.
- Boulton, C.L., Southam, E., and Garthwaite, J. (1995). Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience* 69, 699-703.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem* 72, 248-254.
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 682-685.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., *et al.* (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and $\alpha 1$ -syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.
- Brumby, A.M., and Richardson, H.E. (2003). scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J* 22, 5769-5779.
- Budworth, J., Meillerais, S., Charles, I., and Powell, K. (1999). Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 696-701.
- Buechler, W.A., Ivanova, K., Wolfram, G., Drummer, C., Heim, J.M., and Gerzer, R. (1994). Soluble guanylyl cyclase and platelet function. *Ann N Y Acad Sci* 714, 151-157.
- Buechler, W.A., Nakane, M., and Murad, F. (1991). Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 174, 351-357.
- Burgoyne, J.R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R.L., Brennan, J.P., Schroder, E., Browning, D.D., and Eaton, P. (2007). Cysteine redox sensor in PKG α enables oxidant-induced activation. *Science* 317, 1393-1397.
- Burgoyne, J.R., Prysyazhna, O., Rudyk, O., and Eaton, P. (2012). cGMP-dependent activation of protein kinase G precludes disulfide activation: implications for blood pressure control. *Hypertension* 60, 1301-1308.
- Butz, S., Okamoto, M., and Sudhof, T.C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* 94, 773-782.
- Castello, A., Brocheriou, V., Chafey, P., Kahn, A., and Gilgenkrantz, H. (1996). Characterization of the dystrophin-syntrophin interaction using the two-hybrid system in yeast. *FEBS Lett* 383, 124-128.
- Cawley, S.M., Sawyer, C.L., Brunelle, K.F., van der Vliet, A., and Dostmann, W.R. (2007). Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 19, 1023-1033.

- Chao, D.S., Silvagno, F., Xia, H., Cornwell, T.L., Lincoln, T.M., and Bredt, D.S. (1997). Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* 76, 665-672.
- Chen, Y., Mills, J.D., and Periasamy, A. (2003). Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation* 71, 528-541.
- Cherry, P.D., Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., and Jothianandan, D. (1982). Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2106-2110.
- Cioni, J.M., Telley, L., Saywell, V., Cadilhac, C., Jourdan, C., Huber, A.B., Huang, J.Z., Jahannault-Talignani, C., and Ango, F. (2013). SEMA3A Signaling Controls Layer-Specific Interneuron Branching in the Cerebellum. *Curr Biol*.
- Clegg, R.M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 6, 103-110.
- Craven, K.B., and Zagotta, W.N. (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol* 68, 375-401.
- Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L., and Smith, C.E. (1992). Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 947-951.
- Dale, R.E., Eisinger, J., and Blumberg, W.E. (1979). The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* 26, 161-193.
- de Sauvage, F.J., Camerato, T.R., and Goeddel, D.V. (1991). Primary structure and functional expression of the human receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *J Biol Chem* 266, 17912-17918.
- Denninger, J.W., Schelvis, J.P., Brandish, P.E., Zhao, Y., Babcock, G.T., and Marletta, M.A. (2000). Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry* 39, 4191-4198.
- Derbyshire, E.R., and Marletta, M.A. (2012). Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 81, 533-559.
- Deruelle, P., Balasubramaniam, V., Kunig, A.M., Seedorf, G.J., Markham, N.E., and Abman, S.H. (2006). BAY 41-2272, a direct activator of soluble guanylate cyclase, reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats. *Biol Neonate* 90, 135-144.
- Dow, L.E., Brumby, A.M., Muratore, R., Coombe, M.L., Sedelies, K.A., Trapani, J.A., Russell, S.M., Richardson, H.E., and Humbert, P.O. (2003). hScrib is a functional homologue of the Drosophila tumour suppressor Scribble. *Oncogene* 22, 9225-9230.
- Dow, L.E., Elsum, I.A., King, C.L., Kinross, K.M., Richardson, H.E., and Humbert, P.O. (2008). Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling. *Oncogene* 27, 5988-6001.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067-1076.

- Elangovan, M., Day, R.N., and Periasamy, A. (2002). Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell. *J Microsc* 205, 3-14.
- Erondu, N.E., and Kennedy, M.B. (1985). Regional distribution of type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J Neurosci* 5, 3270-3277.
- Evgenov, O.V., Ichinose, F., Evgenov, N.V., Gnoth, M.J., Falkowski, G.E., Chang, Y., Bloch, K.D., and Zapol, W.M. (2004). Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs. *Circulation* 110, 2253-2259.
- Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Hasko, G., Schmidt, H.H., and Stasch, J.P. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 5, 755-768.
- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (1999). PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103, 767-772.
- Felbel, J., Trockur, B., Ecker, T., Landgraf, W., and Hofmann, F. (1988). Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea. *J Biol Chem* 263, 16764-16771.
- Ferreira, J.C., and Mochly-Rosen, D. (2012). Nitroglycerin use in myocardial infarction patients. *Circ J* 76, 15-21.
- Ferrero, R., Rodriguez-Pascual, F., Miras-Portugal, M.T., and Torres, M. (1999). Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlation with nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 127, 779-787.
- Ferrero, R., Rodriguez-Pascual, F., Miras-Portugal, M.T., and Torres, M. (2000). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity inhibition through cyclic GMP-dependent dephosphorylation. *J Neurochem* 75, 2029-2039.
- Förster, J., Harteneck, C., Malkewitz, J., Schultz, G., and Kösling, D. (1996). A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur J Biochem* 240, 380-386.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 2, 55-75.
- Förstermann, U., and Kleinert, H. (1995). Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352, 351-364.
- Förstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829-837, 837a-837d.
- Freitas, C.F., Morganti, R.P., Annichino-Bizzacchi, J.M., De Nucci, G., and Antunes, E. (2007). Effect of BAY 41-2272 in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine complex in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 10-14.
- Frey, R., Muck, W., Unger, S., Artmeier-Brandt, U., Weimann, G., and Wensing, G. (2008). Single-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 63-2521: an ascending-dose study in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 48, 926-934.

- Friebe, A., Russwurm, M., Mergia, E., and Koesling, D. (1999). A point-mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 38, 15253-15257.
- Friebe, A., Schultz, G., and Koesling, D. (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 15, 6863-6868.
- Fritz, B.G., Roberts, S.A., Ahmed, A., Breci, L., Li, W., Weichsel, A., Brailey, J.L., Wysocki, V.H., Tama, F., and Montfort, W.R. (2013). Molecular Model of a Soluble Guanylyl Cyclase Fragment Determined by Small-Angle X-ray Scattering and Chemical Cross-Linking. *Biochemistry* 52, 1568-1582.
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B., and Keef, K.D. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem* 274, 10927-10935.
- Fukuyama, R., Niculaita, R., Ng, K.P., Obusez, E., Sanchez, J., Kalady, M., Aung, P.P., Casey, G., and Sizemore, N. (2008). Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription. *Oncogene* 27, 6044-6055.
- Fulle, H.J., Vassar, R., Foster, D.C., Yang, R.B., Axel, R., and Garbers, D.L. (1995). A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3571-3575.
- Furchgott, R.F. (1999). Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* 19, 235-251.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Galie, N., Brundage, B.H., Ghofrani, H.A., Oudiz, R.J., Simonneau, G., Safdar, Z., Shapiro, S., White, R.J., Chan, M., Beardsworth, A., *et al.* (2009). Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119, 2894-2903.
- Galie, N., Ghofrani, H.A., Torbicki, A., Barst, R.J., Rubin, L.J., Badesch, D., Fleming, T., Parpia, T., Burgess, G., Branzi, A., *et al.* (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 353, 2148-2157.
- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27, 2783-2802.
- Geiselhoring, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Worner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., *et al.* (2004). IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J* 23, 4222-4231.
- Gille, A., Lushington, G.H., Mou, T.C., Doughty, M.B., Johnson, R.A., and Seifert, R. (2004). Differential inhibition of adenylyl cyclase isoforms and soluble guanylyl cyclase by purine and pyrimidine nucleotides. *J Biol Chem* 279, 19955-19969.
- Gille, A., and Seifert, R. (2003). 2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-substituted GTP analogs: a novel class of potent competitive adenylyl cyclase inhibitors. *J Biol Chem* 278, 12672-12679.
- Giuli, G., Scholl, U., Bulle, F., and Guellaen, G. (1992). Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett* 304, 83-88.

- Göttle, M., Dove, S., Steindel, P., Shen, Y., Tang, W.J., Geduhn, J., König, B., and Seifert, R. (2007). Molecular analysis of the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase with fluorescent nucleotides. *Mol Pharmacol* 72, 526-535.
- Goulding, E.H., Tibbs, G.R., and Siegelbaum, S.A. (1994). Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation. *Nature* 372, 369-374.
- Grailhe, R., Merola, F., Ridard, J., Couvignou, S., Le Poupon, C., Changeux, J.P., and Laguitton-Pasquier, H. (2006). Monitoring protein interactions in the living cell through the fluorescence decays of the cyan fluorescent protein. *Chemphyschem* 7, 1442-1454.
- Griffith, O.W., and Stuehr, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57, 707-736.
- Gryczynski, Z., Fronticelli, C., Tenenholz, T., and Bucci, E. (1993). Effect of disordered hemes on energy transfer rates between tryptophans and heme in myoglobin. *Biophys J* 65, 1951-1958.
- Haase, N., Haase, T., Kraehling, J.R., and Behrends, S. (2010a). Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive guanylyl cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochem Pharmacol* 80, 1676-1683.
- Haase, N., Haase, T., Seeanner, M., and Behrends, S. (2010b). Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization. *J Neurochem* 112, 542-551.
- Haase, T. (2010). Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Dissertation. Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie (Braunschweig, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig), pp. 124.
- Haase, T., Haase, N., Kraehling, J.R., and Behrends, S. (2010c). Fluorescent fusion proteins of soluble guanylyl cyclase indicate proximity of the heme nitric oxide domain and catalytic domain. *PLoS One* 5, e11617.
- Haghikia, A., Mergia, E., Friebe, A., Eysel, U.T., Koesling, D., and Mittmann, T. (2007). Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci* 27, 818-823.
- Hamra, F.K., Forte, L.R., Eber, S.L., Pidhorodeckyj, N.V., Krause, W.J., Freeman, R.H., Chin, D.T., Tompkins, J.A., Fok, K.F., Smith, C.E., *et al.* (1993). Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10464-10468.
- Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G., and Bohme, E. (1990). Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272, 221-223.
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Bohme, E., and Schultz, G. (1991). Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 292, 217-222.
- Hepp, R., Tricoire, L., Hu, E., Gervasi, N., Paupardin-Tritsch, D., Lambolez, B., and Vincent, P. (2007). Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *J Neurochem* 102, 1875-1886.

- Hering, K.W., Artz, J.D., Pearson, W.H., and Marletta, M.A. (2006). The design and synthesis of YC-1 analogues as probes for soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 618-621.
- Hiratsuka, T. (1983). New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim Biophys Acta* 742, 496-508.
- Hoebe, R.A., Van Oven, C.H., Gadella, T.W., Jr., Dhonukshe, P.B., Van Noorden, C.J., and Manders, E.M. (2007). Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging. *Nat Biotechnol* 25, 249-253.
- Hoenicka, M., Becker, E.M., Apeler, H., Sirichoke, T., Schroder, H., Gerzer, R., and Stasch, J.P. (1999). Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med (Berl)* 77, 14-23.
- Hoffmüller, U., Russwurm, M., Kleinjung, F., Ashurst, J., Oschkinat, H., Volkmer-Engert, R., Koesling, D., and Schneider-Mergener, J. (1999). Interaktion einer PDZ-Proteindomäne mit einer synthetischen Bibliothek aller C-Termini humaner Proteine. *Angew Chem* 111, 2180-2184.
- Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M., Birchmeier, W., and Fujita, Y. (2004). Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol* 24, 6690-6700.
- Honda, A., Adams, S.R., Sawyer, C.L., Lev-Ram, V., Tsien, R.Y., and Dostmann, W.R. (2001). Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2437-2442.
- Hu, X., Feng, C., Hazzard, J.T., Tollin, G., and Montfort, W.R. (2008). Binding of YC-1 or BAY 41-2272 to soluble guanylyl cyclase induces a geminate phase in CO photolysis. *J Am Chem Soc* 130, 15748-15749.
- Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K.D., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G., and Bohme, E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* 190, 273-278.
- Hung, A.Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277, 5699-5702.
- Ibrahim, M., Derbyshire, E.R., Soldatova, A.V., Marletta, M.A., and Spiro, T.G. (2010). Soluble guanylate cyclase is activated differently by excess NO and by YC-1: resonance Raman spectroscopic evidence. *Biochemistry* 49, 4864-4871.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265-9269.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., and Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34, 879-886.
- Itoh, H., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (1990). Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 86, 1690-1697.
- Jaffrey, S.R., and Snyder, S.H. (1995). Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 417-440.

- Jameson, D.M., and Eccleston, J.F. (1997). Fluorescent nucleotide analogs: synthesis and applications. *Methods Enzymol* 278, 363-390.
- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H.R., Lohmann, S.M., and Walter, U. (1994). Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9426-9430.
- Kagota, S., Yamaguchi, Y., Tanaka, N., Kubota, Y., Kobayashi, K., Nejime, N., Nakamura, K., Kunitomo, M., and Shinozuka, K. (2006). Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci* 78, 1187-1196.
- Karow, D.S., Pan, D., Davis, J.H., Behrends, S., Mathies, R.A., and Marletta, M.A. (2005). Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 44, 16266-16274.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., and Murad, F. (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 3, 23-35.
- Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82, 769-824.
- Kawaguchi, S.Y., and Hirano, T. (2013). Gating of long-term depression by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II through enhanced cGMP signalling in cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 591, 1707-1730.
- Kennelly, P.J., and Krebs, E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266, 15555-15558.
- Kharitonov, V.G., Russwurm, M., Magde, D., Sharma, V.S., and Koesling, D. (1997). Dissociation of nitric oxide from soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 284-286.
- Kharitonov, V.G., Sharma, V.S., Pilz, R.B., Magde, D., and Koesling, D. (1995). Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2568-2571.
- Kilic, A., Bubikat, A., Gassner, B., Baba, H.A., and Kuhn, M. (2007). Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling. *Endocrinology* 148, 4162-4169.
- Ko, F.N., Wu, C.C., Kuo, S.C., Lee, F.Y., and Teng, C.M. (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84, 4226-4233.
- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G., and Bohme, E. (1990). The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 266, 128-132.
- Koesling, D., Herz, J., Gausepohl, H., Niroomand, F., Hinsch, K.D., Mulsch, A., Bohme, E., Schultz, G., and Frank, R. (1988). The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett* 239, 29-34.
- Koesling, D., Mullershausen, F., Lange, A., Friebe, A., Mergia, E., Wagner, C., and Russwurm, M. (2005). Negative feedback in NO/cGMP signalling. *Biochem Soc Trans* 33, 1119-1122.
- Koglin, M., and Behrends, S. (2000). Cloning and functional expression of the rat alpha(2) subunit of soluble guanylyl cyclase. *Biochim Biophys Acta* 1494, 286-289.

Koglin, M., and Behrends, S. (2003). A functional domain of the alpha1 subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding. *J Biol Chem* 278, 12590-12597.

Komalavilas, P., and Lincoln, T.M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* 271, 21933-21938.

Kosarikov, D.N., Lee, J.M., Uversky, V.N., and Counts Gerber, N. (2001). Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. *J Inorg Biochem* 87, 267-276.

Kostic, T.S., Andric, S.A., and Stojilkovic, S.S. (2004). Receptor-controlled phosphorylation of alpha 1 soluble guanylyl cyclase enhances nitric oxide-dependent cyclic guanosine 5'-monophosphate production in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 18, 458-470.

Kraehling, J.R., Busker, M., Haase, T., Haase, N., Koglin, M., Linnenbaum, M., and Behrends, S. (2011). The amino-terminus of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase alpha(1) does not affect dimerization but influences subcellular localization. *PLoS One* 6, e25772.

Kwon, I.K., Wang, R., Thangaraju, M., Shuang, H., Liu, K., Dashwood, R., Dulin, N., Ganapathy, V., and Browning, D.D. (2010). PKG inhibits TCF signaling in colon cancer cells by blocking beta-catenin expression and activating FOXO4. *Oncogene* 29, 3423-3434.

Lakowicz, J.R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd edn (New York, Kluwer Academic/Plenum).

Lakowicz, J.R., Cherek, H., Gryczynski, I., Joshi, N., and Johnson, M.L. (1987). Enhanced resolution of fluorescence anisotropy decays by simultaneous analysis of progressively quenched samples. Applications to anisotropic rotations and to protein dynamics. *Biophys J* 51, 755-768.

Lamothe, M., Chang, F.J., Balashova, N., Shirokov, R., and Beuve, A. (2004). Functional characterization of nitric oxide and YC-1 activation of soluble guanylyl cyclase: structural implication for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 43, 3039-3048.

Latt, S.A., Cheung, H.T., and Blout, E.R. (1965). Energy Transfer. A System with Relatively Fixed Donor-Acceptor Separation. *J Am Chem Soc* 87, 995-1003.

Lee, Y.C., Martin, E., and Murad, F. (2000). Human recombinant soluble guanylyl cyclase: expression, purification, and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10763-10768.

Lehmann, G., Reiniger, G., Wolf, H., Beyerle, A., and Rudolph, W. (1995). Anti-ischemic effects of first and second dose of 20 mg isosorbide dinitrate administered 5 hours apart: attenuation of effects despite rising plasma concentration. *Cardiovasc Drugs Ther* 9, 339-345.

Leinders-Zufall, T., Cockerham, R.E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D.L., Reed, R.R., Zufall, F., and Munger, S.D. (2007). Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14507-14512.

Li, Q., Zhang, Y., Sheng, Y., Huo, R., Sun, B., Teng, X., Li, N., Zhu, J.X., Yang, B.F., and Dong, D.L. (2012). Large T-antigen up-regulates Kv4.3 K(+) channels through Sp1, and Kv4.3 K(+) channels contribute to cell apoptosis and necrosis through activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 441, 859-867.

- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3, 175-190.
- Liu, S., Fa, M., Ninan, I., Trinchese, F., Dauer, W., and Arancio, O. (2007). Alpha-synuclein involvement in hippocampal synaptic plasticity: role of NO, cGMP, cGK and CaMKII. *Eur J Neurosci* 25, 3583-3596.
- Liu, Y., Ruoho, A.E., Rao, V.D., and Hurley, J.H. (1997). Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13414-13419.
- Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U., and De Jonge, H.R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22, 307-312.
- Lohmann, S.M., and Walter, U. (2005). Tracking functions of cGMP-dependent protein kinases (cGK). *Front Biosci* 10, 1313-1328.
- Lopez, M.J., Wong, S.K., Kishimoto, I., Dubois, S., Mach, V., Friesen, J., Garbers, D.L., and Beuve, A. (1995). Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378, 65-68.
- Loscalzo, J., and Welch, G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 38, 87-104.
- Louis, J.C., Revel, M.O., and Zwiller, J. (1993). Activation of soluble guanylate cyclase through phosphorylation by protein kinase C in intact PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1177, 299-306.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., and Waldman, S.A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52, 375-414.
- Lumpert, M. (2012). Analysis of soluble guanylyl cyclase activation using a fluorescent probe. Diploma. Faculty of Pharmacy (Ljubljana, University of Ljubljana), pp. 83.
- Ma, L., and Wang, H.Y. (2007). Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca²⁺ non-canonical pathway. *J Biol Chem* 282, 28980-28990.
- Ma, X., Beuve, A., and van den Akker, F. (2010). Crystal structure of the signaling helix coiled-coil domain of the beta-1 subunit of the soluble guanylyl cyclase. *BMC Struct Biol* 10, 2.
- Ma, X., Sayed, N., Baskaran, P., Beuve, A., and van den Akker, F. (2008). PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *J Biol Chem* 283, 1167-1178.
- Ma, X., Sayed, N., Beuve, A., and van den Akker, F. (2007). NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *EMBO J* 26, 578-588.
- Maciejewski, P.M., Peterson, F.C., Anderson, P.J., and Brooks, C.L. (1995). Mutation of serine 90 to glutamic acid mimics phosphorylation of bovine prolactin. *J Biol Chem* 270, 27661-27665.
- Maines, M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 517-554.
- Makino, R., Obayashi, E., Homma, N., Shiro, Y., and Hori, H. (2003). YC-1 facilitates release of the proximal His residue in the NO and CO complexes of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* 278, 11130-11137.

- Marsh, N., and Marsh, A. (2000). A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 313-319.
- Martin, F., Baskaran, P., Ma, X., Dunten, P.W., Schaefer, M., Stasch, J.P., Beuve, A., and van den Akker, F. (2010). Structure of cinaciguat (bay 58-2667) bound to nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 285, 22651–22657.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F., and Hofmann, F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 189, 1255-1264.
- Melichar, V.O., Behr-Roussel, D., Zabel, U., Uttenthal, L.O., Rodrigo, J., Rupin, A., Verbeuren, T.J., Kumar, H.S.A., and Schmidt, H.H. (2004). Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16671-16676.
- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G., and Koesling, D. (2003). Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* 15, 189-195.
- Meurer, S., Pioch, S., Gross, S., and Muller-Esterl, W. (2005). Reactive oxygen species induce tyrosine phosphorylation of and Src kinase recruitment to NO-sensitive guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 280, 33149-33156.
- Michalak, M., and Opas, M. (1997). Functions of dystrophin and dystrophin associated proteins. *Curr Opin Neurol* 10, 436-442.
- Miki, N., Kawabe, Y., and Kuriyama, K. (1977). Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 75, 851-856.
- Misono, K.S., Ogawa, H., Qiu, Y., and Ogata, C.M. (2005). Structural studies of the natriuretic peptide receptor: a novel hormone-induced rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *Peptides* 26, 957-968.
- Misono, K.S., Philo, J.S., Arakawa, T., Ogata, C.M., Qiu, Y., Ogawa, H., and Young, H.S. (2011). Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J* 278, 1818-1829.
- Mittendorf, J., Weigand, S., Alonso-Alija, C., Bischoff, E., Feurer, A., Gerisch, M., Kern, A., Knorr, A., Lang, D., Muentner, K., *et al.* (2009). Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *ChemMedChem* 4, 853-865.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887.
- Miyoshi, J., and Takai, Y. (2005). Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 815-855.
- Mizusawa, H., Hedlund, P., Brioni, J.D., Sullivan, J.P., and Andersson, K.E. (2002). Nitric oxide independent activation of guanylate cyclase by YC-1 causes erectile responses in the rat. *J Urol* 167, 2276-2281.

- Mo, E., Amin, H., Bianco, I.H., and Garthwaite, J. (2004). Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway. *J Biol Chem* 279, 26149-26158.
- Moens, P.D., Helms, M.K., and Jameson, D.M. (2004). Detection of tryptophan to tryptophan energy transfer in proteins. *Protein J* 23, 79-83.
- Montani, D., Gunther, S., Dorfmüller, P., Perros, F., Girerd, B., Garcia, G., Jais, X., Savale, L., Artaud-Macari, E., Price, L.C., *et al.* (2013). Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* 8, 97.
- Mou, T.C., Gille, A., Fancy, D.A., Seifert, R., and Sprang, S.R. (2005). Structural basis for the inhibition of mammalian membrane adenylyl cyclase by 2'(3')-O-(N-Methylanthraniloyl)-guanosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 280, 7253-7261.
- Mou, T.C., Gille, A., Suryanarayana, S., Richter, M., Seifert, R., and Sprang, S.R. (2006). Broad specificity of mammalian adenylyl cyclase for interaction with 2',3'-substituted purine- and pyrimidine nucleotide inhibitors. *Mol Pharmacol* 70, 878-886.
- Mulsch, A., Bassenge, E., and Busse, R. (1989). Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340, 767-770.
- Mulsch, A., Bauersachs, J., Schafer, A., Stasch, J.P., Kast, R., and Busse, R. (1997). Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 120, 681-689.
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., McDougall, L.M., Cockerham, R.E., Schmid, A., Wandernoth, P., Wennemuth, G., Biel, M., Zufall, F., and Kelliher, K.R. (2010). An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates food-related social learning. *Curr Biol* 20, 1438-1444.
- Murad, F. (1999). Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 19, 133-154.
- Murad, F. (2006). Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355, 2003-2011.
- Murthy, K.S. (2001). Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Biochem J* 360, 199-208.
- Nagafuchi, A. (2001). Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 13, 600-603.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E.S., and Miyawaki, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3197-3202.
- Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Takizawa, S., Suzuki, Y., Yasugi, T., Huibregtse, J.M., and Taketani, Y. (2004). Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br J Cancer* 90, 194-199.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137-141.
- Nakane, M., Arai, K., Saheki, S., Kuno, T., Buechler, W., and Murad, F. (1990). Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 265, 16841-16845.

- Nakane, M., Hsieh, G., Miller, L.N., Chang, R., Terranova, M.A., Moreland, R.B., Kolasa, T., and Brioni, J.D. (2002). Activation of soluble guanylate cyclase causes relaxation of corpus cavernosum tissue: synergism of nitric oxide and YC-1. *Int J Impot Res* 14, 121-127.
- Nakane, M., Saheki, S., Kuno, T., Ishii, K., and Murad, F. (1988). Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 157, 1139-1147.
- Nakao, K., Ogawa, Y., Suga, S., and Imura, H. (1992). Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens* 10, 907-912.
- Namiki, S., Hirose, K., and Iino, M. (2001). Mapping of heme-binding domains in soluble guanylyl cyclase beta1 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 798-804.
- Namiki, S., Kakizawa, S., Hirose, K., and Iino, M. (2005). NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. *J Physiol* 566, 849-863.
- Nausch, L.W., Ledoux, J., Bonev, A.D., Nelson, M.T., and Dostmann, W.R. (2008). Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 365-370.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.J., Arsanto, J.P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., *et al.* (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24, 4330-4339.
- Nedvetsky, P.I., Meurer, S., Opitz, N., Nedvetskaya, T.Y., Muller, H., and Schmidt, H.H. (2008). Heat shock protein 90 regulates stabilization rather than activation of soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett* 582, 327-331.
- Newton, M., Niewczas, I., Clark, J., and Bellamy, T.C. (2010). A real time fluorescent assay of the purified nitric oxide receptor, guanylyl cyclase. *Anal Biochem* 402, 129-136.
- Niino, Y., Hotta, K., and Oka, K. (2010). Blue fluorescent cGMP sensor for multiparameter fluorescence imaging. *PLoS One* 5, e9164.
- Nikolaev, V.O., Gambaryan, S., and Lohse, M.J. (2006). Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods* 3, 23-25.
- Ninan, I., and Arancio, O. (2004). Presynaptic CaMKII is necessary for synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 42, 129-141.
- Nishida, K., Harrison, D.G., Navas, J.P., Fisher, A.A., Dockery, S.P., Uematsu, M., Nerem, R.M., Alexander, R.W., and Murphy, T.J. (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90, 2092-2096.
- Ogawa, H., Qiu, Y., Ogata, C.M., and Misono, K.S. (2004). Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J Biol Chem* 279, 28625-28631.
- Olea, C., Boon, E.M., Pellicena, P., Kuriyan, J., and Marletta, M.A. (2008). Probing the function of heme distortion in the H-NOX family. *ACS Chem Biol* 3, 703-710.

- Oliver, P.M., Fox, J.E., Kim, R., Rockman, H.A., Kim, H.S., Reddick, R.L., Pandey, K.N., Milgram, S.L., Smithies, O., and Maeda, N. (1997). Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 14730-14735.
- Padayatti, P.S., Pattanaik, P., Ma, X., and van den Akker, F. (2004). Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther* *104*, 83-99.
- Pal, B., and Kitagawa, T. (2010). Binding of YC-1/BAY 41-2272 to soluble guanylate cyclase: A new perspective to the mechanism of activation. *Biochem Biophys Res Commun* *397*, 375-379.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* *333*, 664-666.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* *327*, 524-526.
- Pearson, H.B., Perez-Mancera, P.A., Dow, L.E., Ryan, A., Tennstedt, P., Bogani, D., Elsum, I., Greenfield, A., Tuveson, D.A., Simon, R., *et al.* (2011). SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *J Clin Invest* *121*, 4257-4267.
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Longhi, R., and Pietrini, G. (2000). Mammalian LIN-7 PDZ proteins associate with beta-catenin at the cell-cell junctions of epithelia and neurons. *EMBO J* *19*, 3978-3989.
- Petit, M.M., Meulemans, S.M., Alen, P., Ayoubi, T.A., Jansen, E., and Van de Ven, W.J. (2005). The tumor suppressor Scrib interacts with the zyxin-related protein LPP, which shuttles between cell adhesion sites and the nucleus. *BMC Cell Biol* *6*, 1.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., *et al.* (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* *17*, 3045-3051.
- Pfeiffer, S.M., B; Hemmes, B (1999). Nitric oxide: chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew Chem Int Ed* *38*, 1714-1731.
- Pitari, G.M., Di Guglielmo, M.D., Park, J., Schulz, S., and Waldman, S.A. (2001). Guanylyl cyclase C agonists regulate progression through the cell cycle of human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7846-7851.
- Pöhler, D., Butt, E., Meissner, J., Muller, S., Lohse, M., Walter, U., Lohmann, S.M., and Jarchau, T. (1995). Expression, purification, and characterization of the cGMP-dependent protein kinases I beta and II using the baculovirus system. *FEBS Lett* *374*, 419-425.
- Poppe, H., Rybalkin, S.D., Rehmann, H., Hinds, T.R., Tang, X.B., Christensen, A.E., Schwede, F., Genieser, H.G., Bos, J.L., Doskeland, S.O., *et al.* (2008). Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods* *5*, 277-278.
- Potter, L.R. (2011). Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* *23*, 1921-1926.
- Pugh, E.N., Jr., Duda, T., Sitaramayya, A., and Sharma, R.K. (1997). Photoreceptor guanylate cyclases: a review. *Biosci Rep* *17*, 429-473.
- Purohit, R., Weichsel, A., and Montfort, W.R. (2013). Crystal structure of the Alpha subunit PAS domain from soluble guanylyl cyclase. *Protein Sci* *22*, 1439-1444.

- Qiu, Y., Ogawa, H., Miyagi, M., and Misono, K.S. (2004). Constitutive activation and uncoupling of the atrial natriuretic peptide receptor by mutations at the dimer interface. Role of the dimer structure in signalling. *J Biol Chem* 279, 6115-6123.
- Ramamurthy, V., Tucker, C., Wilkie, S.E., Daggett, V., Hunt, D.M., and Hurley, J.B. (2001). Interactions within the coiled-coil domain of RetGC-1 guanylyl cyclase are optimized for regulation rather than for high affinity. *J Biol Chem* 276, 26218-26229.
- Rapoport, R.M., Draznin, M.B., and Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306, 174-176.
- Rapoport, R.M., and Murad, F. (1983). Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 9, 281-296.
- Richie-Jannetta, R., Busch, J.L., Higgins, K.A., Corbin, J.D., and Francis, S.H. (2006). Isolated regulatory domains of cGMP-dependent protein kinase Ialpha and Ibeta retain dimerization and native cGMP-binding properties and undergo isoform-specific conformational changes. *J Biol Chem* 281, 6977-6984.
- Rothkegel, C., Schmidt, P.M., Atkins, D.J., Hoffmann, L.S., Schmidt, H.H., Schroder, H., and Stasch, J.P. (2007). Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo. *Mol Pharmacol* 72, 1181-1190.
- Roy, B., and Garthwaite, J. (2006). Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12185-12190.
- Roy, B., Mo, E., Vernon, J., and Garthwaite, J. (2008). Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors. *Br J Pharmacol* 153, 1495-1504.
- Rudyk, O., Prysyazhna, O., Burgoyne, J.R., and Eaton, P. (2012). Nitroglycerin fails to lower blood pressure in redox-dead Cys42Ser PKG1alpha knock-in mouse. *Circulation* 126, 287-295.
- Russwurm, M., Behrends, S., Harteneck, C., and Koesling, D. (1998). Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* 335, 125-130.
- Russwurm, M., Mullershausen, F., Friebe, A., Jager, R., Russwurm, C., and Koesling, D. (2007). Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem J* 407, 69-77.
- Russwurm, M., Wittau, N., and Koesling, D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* 276, 44647-44652.
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C., and Hofmann, F. (1991). The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem* 202, 1339-1344.
- Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H., and Hofmann, F. (1993). Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2623-2627.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Feil, R., Hofmann, F., and Beavo, J.A. (2002). Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277, 3310-3317.

- Santoni, M.J., Pontarotti, P., Birnbaum, D., and Borg, J.P. (2002). The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends Genet* 18, 494-497.
- Saras, J., and Heldin, C.H. (1996). PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci* 21, 455-458.
- Sato, M., Hida, N., Ozawa, T., and Umezawa, Y. (2000). Fluorescent indicators for cyclic GMP based on cyclic GMP-dependent protein kinase I α and green fluorescent proteins. *Anal Chem* 72, 5918-5924.
- Sato, M., Hida, N., and Umezawa, Y. (2005). Imaging the nanomolar range of nitric oxide with an amplifier-coupled fluorescent indicator in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14515-14520.
- Schermuly, R.T., Stasch, J.P., Pullamsetti, S.S., Middendorff, R., Muller, D., Schluter, K.D., Dingendorf, A., Hackemack, S., Kolosionek, E., Kaulen, C., *et al.* (2008). Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 32, 881-891.
- Schindler, U., Strobel, H., Schonafinger, K., Linz, W., Lohn, M., Martorana, P.A., Rutten, H., Schindler, P.W., Busch, A.E., Sohn, M., *et al.* (2006). Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 69, 1260-1268.
- Schirrmann, T., and Büsow, K. (2010). Transient Production of scFv-Fc Fusion Proteins in Mammalian Cells. In *Antibody Engineering*, R. Kontermann, and S. Duebel, eds. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), pp. 387-398.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., *et al.* (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 404, 197-201.
- Schmidt, H.H., Nau, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K.E., Klein, M.M., Niroomand, F., and Bohme, E. (1988). Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 154, 213-216.
- Schmidt, P.M., Schramm, M., Schroder, H., Wunder, F., and Stasch, J.P. (2004). Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* 279, 3025-3032.
- Schmidt, T.G., and Skerra, A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng* 6, 109-122.
- Schmidt, T.G., and Skerra, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* 676, 337-345.
- Schmidt, T.G., and Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2, 1528-1535.
- Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S., and Garbers, D.L. (1990). Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63, 941-948.
- Senter, P.D., Eckstein, F., Mulsch, A., and Bohme, E. (1983). The stereochemical course of the reaction catalyzed by soluble bovine lung guanylate cyclase. *J Biol Chem* 258, 6741-6745.

Shamloul, R., and Ghanem, H. (2013). Erectile dysfunction. *Lancet* 381, 153-165.

Shiga, T., and Suzuki, N. (2005). Amphipathic alpha-helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase. *Zoolog Sci* 22, 735-742.

Shimizu-Albergine, M., Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Feil, R., Wolfsgruber, W., Hofmann, F., and Beavo, J.A. (2003). Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation. *J Neurosci* 23, 6452-6459.

Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239.

Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., *et al.* (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-274.

Skerra, A., and Schmidt, T.G. (2000). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 326, 271-304.

Stasch, J.P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowsky, K., Feurer, A., Minuth, T., Perzborn, E., Schramm, M., and Straub, A. (2002a). Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 135, 333-343.

Stasch, J.P., Becker, E.M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowsky, K., Feurer, A., Gerzer, R., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., *et al.* (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 410, 212-215.

Stasch, J.P., Dembowsky, K., Perzborn, E., Stahl, E., and Schramm, M. (2002b). Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br J Pharmacol* 135, 344-355.

Stasch, J.P., Schmidt, P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowsky, K., Haerter, M., Heil, M., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., *et al.* (2002c). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* 136, 773-783.

Stasch, J.P., Schmidt, P.M., Nedvetsky, P.I., Nedvetskaya, T.Y., H, S.A., Meurer, S., Deile, M., Taye, A., Knorr, A., Lapp, H., *et al.* (2006). Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* 116, 2552-2561.

Stone, J.R., and Marletta, M.A. (1994). Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33, 5636-5640.

Stone, J.R., and Marletta, M.A. (1995). Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 34, 14668-14674.

Stone, J.R., and Marletta, M.A. (1996). Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry* 35, 1093-1099.

Stone, J.R., and Marletta, M.A. (1998). Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem Biol* 5, 255-261.

- Straub, A., Stasch, J.P., Alonso-Alija, C., Benet-Buchholz, J., Ducke, B., Feurer, A., and Furstner, C. (2001). NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 781-784.
- Stryer, L., and Haugland, R.P. (1967). Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 719-726.
- Sun, Y., Aiga, M., Yoshida, E., Humbert, P.O., and Bamji, S.X. (2009). Scribble interacts with beta-catenin to localize synaptic vesicles to synapses. *Mol Biol Cell* 20, 3390-3400.
- Sunahara, R.K., Beuve, A., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., Garbers, D.L., and Gilman, A.G. (1998). Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem* 273, 16332-16338.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M., and Mendelsohn, M.E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Science* 286, 1583-1587.
- Suryanarayana, S., Wang, J.L., Richter, M., Shen, Y., Tang, W.J., Lushington, G.H., and Seifert, R. (2009). Distinct interactions of 2'- and 3'-O-(N-methyl)anthraniloyl-isomers of ATP and GTP with the adenylyl cyclase toxin of *Bacillus anthracis*, edema factor. *Biochem Pharmacol* 78, 224-230.
- Tallini, Y.N., Ohkura, M., Choi, B.R., Ji, G., Imoto, K., Doran, R., Lee, J., Plan, P., Wilson, J., Xin, H.B., *et al.* (2006). Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4753-4758.
- Tamargo, J., Duarte, J., Caballero, R., and Delpon, E. (2010). Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator for the potential treatment of acute heart failure. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 1039-1047.
- Tamura, N., Itoh, H., Ogawa, Y., Nakagawa, O., Harada, M., Chun, T.H., Suga, S., Yoshimasa, T., and Nakao, K. (1996). cDNA cloning and gene expression of human type Ialpha cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 27, 552-557.
- Tesmer, J.J., and Sprang, S.R. (1998). The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol* 8, 713-719.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS. *Science* 278, 1907-1916.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Johnson, R.A., Gosselin, G., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1999). Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* 285, 756-760.
- Thadani, U. (1992). Role of nitrates in angina pectoris. *Am J Cardiol* 70, 43B-53B.
- Thomas, M., Massimi, P., Navarro, C., Borg, J.P., and Banks, L. (2005). The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene* 24, 6222-6230.
- Thunemann, M., Wen, L., Hillenbrand, M., Vachaviolos, A., Feil, S., Ott, T., Han, X., Fukumura, D., Jain, R.K., Russwurm, M., *et al.* (2013). Transgenic Mice for cGMP Imaging. *Circ Res* 113, 365-371.
- Torfgard, K.E., and Ahlner, J. (1994). Mechanisms of action of nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther* 8, 701-717.

- Truong, K., and Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struct Biol* 11, 573-578.
- Tulis, D.A., Bohl Masters, K.S., Lipke, E.A., Schiesser, R.L., Evans, A.J., Peyton, K.J., Durante, W., West, J.L., and Schafer, A.I. (2002). YC-1-mediated vascular protection through inhibition of smooth muscle cell proliferation and platelet function. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 1014-1021.
- Uhler, M.D. (1993). Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* 268, 13586-13591.
- Underbakke, E.S., Iavarone, A.T., and Marletta, M.A. (2013). Higher-order interactions bridge the nitric oxide receptor and catalytic domains of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6777-6782.
- van der Oord, C.J.R., de Grauw, C.J., and Gerritsen, H.C. (2001). Fluorescence lifetime imaging module LIMO for CLSM. *Proc SPIE Advances in Fluorescence Sensing Technology V* 4252, 119-123.
- Wada, A., Hasegawa, M., Matsumoto, K., Niidome, T., Kawano, Y., Hidaka, Y., Padilla, P.I., Kurazono, H., Shimonishi, Y., and Hirayama, T. (1996). The significance of Ser1029 of the heat-stable enterotoxin receptor (STaR): relation of STa-mediated guanylyl cyclase activation and signaling by phorbol myristate acetate. *FEBS Lett* 384, 75-77.
- Wagner, C., Russwurm, M., Jager, R., Friebe, A., and Koesling, D. (2005). Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. *J Biol Chem* 280, 17687-17693.
- Wall, M.E., Francis, S.H., Corbin, J.D., Grimes, K., Richie-Jannetta, R., Kotera, J., Macdonald, B.A., Gibson, R.R., and Trehwella, J. (2003). Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2380-2385.
- Wallrabe, H., and Periasamy, A. (2005). Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol* 16, 19-27.
- Warner, T.D., Mitchell, J.A., Sheng, H., and Murad, F. (1994). Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. *Adv Pharmacol* 26, 171-194.
- Wedel, B., Humbert, P., Harteneck, C., Foerster, J., Malkewitz, J., Bohme, E., Schultz, G., and Koesling, D. (1994). Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2592-2596.
- Wedgwood, S., Steinhorn, R.H., Bunderson, M., Wilham, J., Lakshminrusimha, S., Brennan, L.A., and Black, S.M. (2005). Increased hydrogen peroxide downregulates soluble guanylate cyclase in the lungs of lambs with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L660-666.
- White, R.R., Kwon, Y.G., Taing, M., Lawrence, D.S., and Edelman, A.M. (1998). Definition of optimal substrate recognition motifs of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features. *J Biol Chem* 273, 3166-3172.
- Winger, J.A., Derbyshire, E.R., Lamers, M.H., Marletta, M.A., and Kuriyan, J. (2008). The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase. *BMC Struct Biol* 8, 42.
- Winger, J.A., and Marletta, M.A. (2005). Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain. *Biochemistry* 44, 4083-4090.

- Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjoblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., *et al.* (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318, 1108-1113.
- Yang, R.B., Foster, D.C., Garbers, D.L., and Fulle, H.J. (1995). Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 602-606.
- Yoo, B.K., Lamarre, I., Rappaport, F., Nioche, P., Raman, C.S., Martin, J.L., and Negrier, M. (2012). Picosecond to Second Dynamics Reveals a Structural Transition in Clostridium botulinum NO-Sensor Triggered by the Activator BAY-41-2272. *ACS Chem Biol*.
- Youvan, D.C., Silva, C.M., Bylina, E.J., Coleman, W.J., Dilworth, M.R., and Yang, M.M. (1997). Calibration of fluorescence resonance energy transfer in microscopy using genetically engineered GFP derivatives on nickel chelating beads. *Biotechnol Bioeng* 3, 1-18.
- Zabel, U., Hausler, C., Weeger, M., and Schmidt, H.H. (1999). Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem* 274, 18149-18152.
- Zabel, U., Kleinschnitz, C., Oh, P., Nedvetsky, P., Smolenski, A., Muller, H., Kronich, P., Kugler, P., Walter, U., Schnitzer, J.E., *et al.* (2002). Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol* 4, 307-311.
- Zabel, U., Weeger, M., La, M., and Schmidt, H.H. (1998). Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J* 335, 51-57.
- Zhan, L., Rosenberg, A., Bergami, K.C., Yu, M., Xuan, Z., Jaffe, A.B., Allred, C., and Muthuswamy, S.K. (2008). Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell* 135, 865-878.
- Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E., and Hurley, J.H. (1997). Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* 386, 247-253.
- Zhang, W., Mannan, I., Schulz, S., Parkinson, S.J., Alekseev, A.E., Gomez, L.A., Terzic, A., and Waldman, S.A. (1999). Interruption of transmembrane signaling as a novel antisecretory strategy to treat enterotoxigenic diarrhea. *FASEB J* 13, 913-922.
- Zhang, Y., Yeh, S., Appleton, B.A., Held, H.A., Kausalya, P.J., Phua, D.C., Wong, W.L., Lasky, L.A., Wiesmann, C., Hunziker, W., *et al.* (2006). Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families. *J Biol Chem* 281, 22299-22311.
- Zhao, J., Trewella, J., Corbin, J., Francis, S., Mitchell, R., Brushia, R., and Walsh, D. (1997). Progressive cyclic nucleotide-induced conformational changes in the cGMP-dependent protein kinase studied by small angle X-ray scattering in solution. *J Biol Chem* 272, 31929-31936.
- Zhao, Y., Schelvis, J.P., Babcock, G.T., and Marletta, M.A. (1998). Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 37, 4502-4509.
- Zheng, C.Y., Seabold, G.K., Horak, M., and Petralia, R.S. (2011). MAGUKs, synaptic development, and synaptic plasticity. *Neuroscientist* 17, 493-512.
- Zhou, Z., Gross, S., Roussos, C., Meurer, S., Muller-Esterl, W., and Papapetropoulos, A. (2004). Structural and functional characterization of the dimerization region of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 279, 24935-24943.

Zwiller, J., Revel, M.O., and Basset, P. (1981). Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 101, 1381-1387.

Zwiller, J., Revel, M.O., and Malviya, A.N. (1985). Protein kinase C catalyzes phosphorylation of guanylate cyclase in vitro. *J Biol Chem* 260, 1350-1353.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2'-Mant-3'-dGTP ³² P	2'-(N-methyl)anthraniloyl-3'-desoxy-Guanosintriphosphat Phosphorisotop 32
5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
5'-GMP	5'-Guanosinmonophosphat
8-Br-cGMP	8-Bromoguanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
A	Akzeptor-Kanal
A	Alanin
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AOM	Akustooptischer Modulator
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	Willkürliche Einheiten („arbitrary units“)
BAY 41-2272	3-(4-Amino-5-cyclopropylpyrimidine-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo(3,4-b)pyridin
BAY 41-8543	2-(1-((2-fluorophenyl)methyl)-1H-pyrazolo(3,4-b)pyridin-3-yl)-5-(4-morpholinyl)-4,6-pyrimidinediamin
BAY 58-2667	4-((4-carboxybutyl)(2-((4-phenethylbenzyl)oxy)phenethyl)amino)methyl (benzoe)säure
BAY 60-2521	Riociguat, methyl-N-[4,6-diamino-2-[1-[(2-fluorophenyl)methyl]pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-5-yl]-N-methylcarbamate
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Bluo-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
BNP	B-typ natriuretisches Peptid („Brain natriuretic peptide“)
bp	DNA-Basenpaar
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ / Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CLEM	„Controlled light exposure measurement“
CNG-Ionenkanal	Zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
cpGFP	Zirkulär permutiertes grün fluoreszierendes Protein
cpm	Zählereignisse pro Minute („Counts per minute“)
CYP	Cytochrom-P450
D	Donor-Kanal
Da	Dalton
DA	FRET-Kanal
DEA/NO	1,1-diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazine
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
DLG	„Disc large“
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	halbmaximal effektive Konzentration
ECFP	Verbessertes cyan fluoreszierendes Protein
EDRF	„Endothelium-derived relaxing factor“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EYFP	Verbessertes gelb fluoreszierendes Protein
F	Phenylalanin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	Fetales Kälberserum
FLIM	Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung („Fluorescence lifetime imaging“)
FlnG	Fluoreszenzindikator von cGMP („Fluorescent indicator of cGMP“)
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Erdbeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAFA	cGMP-bindenden Domäne der PDE5
GC	Guanylat-Cyclase
GCD	Guanylat-Cyclase Domäne
GC-A	Membranständige Guanylat-Cyclase A
GC-B	Membranständige Guanylat-Cyclase B
GC-D	Membranständige Guanylat-Cyclase D
GC-E	Membranständige Guanylat-Cyclase E
GC-F	Membranständige Guanylat-Cyclase F
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMR 1766	Atacigat
HNOX	Heme nitric oxide bindung
HRP	Meerrettichperoxidase („horse radish peroxidase“)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃ -Rezeptor	Inositoltriphosphatrezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRAG	„Inositol receptor cyclic GMP kinase substrat“
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbitmononitrat
LIMO	Fluoreszenz-Lebenszeit-Modul
LPP	Protein „Lipoma Preferred Partner“
LRR-Region	Leucin-reiche Regionen („Leucine-rich-repeat“)
Mant	(N-methyl)anthraniloyl
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCC	Protein „Mutated in colorectal Cancer“
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NANC	„Non-adrenergic non-cholinergic“
NaOH	Natriumhydroxid
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOsGC	Stickstoffmonoxidsensitive Guanylat-Cyclase
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on

PAS	Proteindomäne Per-Arnt-Sim
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC12	Phäochromozytom-Zellen der Ratte
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	Proteindomäne benannt nach dem „post synaptic density protein“ (PSD95), dem „Disc large“ (DLG) und der „zona occludens“ (ZO)
PEI	Polyethylenimin
PETN	Pentaerythryltetranitrat
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PKLD	Proteinkinase-ähnliche Domäne
PNS	Peripheres Nervesystem
PSD95	Protein „Post synaptic density 95“
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Strep -tag II
SAXS	„Small angle X-ray scattering“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts („Standard error of the mean“)
SEMA3A	„Secreted axon guidance molecule semaphoring-3A“
Sf	Spodoptera frugiperda
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glukose
STaR	Hitze stabiles Enterotoxin Rezeptor
Sts	Hitze stabiles Enterotoxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
W	Tryptophan
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zona occludens
ZZK	Zell-Zell-Kontakte

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Der NO / cGMP-Signalweg	11
Abbildung 2: Strukturen der NOsGC-Stimulatoren und Aktivatoren	16
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der NOsGC-Untereinheiten	19
Abbildung 4: Kristallstrukturen der einzelnen NOsGC Domänen	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der GTP-Bindung in der katalytischen Domäne	22
Abbildung 6: Postulierter Aktivierungs-mechanismus der GC-A	25
Abbildung 7: Stukturen der verfügbaren Mant-dGTP Derivate	26
Abbildung 8: Umsetzung der Mant-Derivate durch die NOsGC	27
Abbildung 9: Fluoreszenzsensoren für cGMP	28
Abbildung 10: Klonierung von β_1 FlnG α_2	44
Abbildung 11: Vergleich der Absorptionen und Emissionen von Tryptophan und Tyrosin	55
Abbildung 12: Vergleich der Absorptionen und Emissionen von Tryptophan und der Mant-Gruppe	55
Abbildung 13: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers	56
Abbildung 14: Fluoreszenz-Lebenszeitmessung mit dem Fluorescence Lifetime Module (LIMO)	61
Abbildung 15: Einfluss von 2'-Mant-3'-dGTP auf die Emissionskurve der NOsGC	64
Abbildung 16: Anstieg der FRET-Effizienz durch NO-Stimulation	65
Abbildung 17: Lage der Tryptophane in der NOsGC	66
Abbildung 18: Spezifische Aktivität der NOsGC-Mutanten	66
Abbildung 19: SDS-PAGE Analyse von rekombinant exprimierten NOsGC-Mutanten	68
Abbildung 20: Western Blot der aufgereinigten Mutanten mit α_1 -Antikörper	69
Abbildung 21: Western Blot der gereinigten Mutanten mit β_1 -Antikörper.	70
Abbildung 22: FRET-Effizienz der Mutanten unter basalen Bedingungen	71
Abbildung 23: Anstieg der FRET-Effizienz der Mutanten durch NO-Stimulation	72
Abbildung 24: Vergleich der Emission der Dreifach- und Vierfach-Mutante und des Wildtyp-Enzyms	75
Abbildung 25: Absorption der komplementären Mutanten	76
Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve von DEA/NO	77
Abbildung 27: Einfluss der NOsGC-Stimulatoren auf die NO-stimulierte Aktivität	78
Abbildung 28: Einfluss der NOsGC-Stimulatoren auf die CO-stimulierte Aktivität	80
Abbildung 29: Kurven der direkte Fluoreszenz von 2'-Mant-3'-dGTP mit NOsGC	82
Abbildung 30: Anstieg der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz des Wildtyp-Enzyms und der hämfreien NOsGC	83
Abbildung 31: Abhängigkeit der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz von der Lipophilie des Lösungsmittels	83
Abbildung 32: Messung der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz in Gegenwart der Enzym-Mutanten	85
Abbildung 33: Anstiegs der 2'-Mant-3'-dGTP Fluoreszenz durch NO-Stimulation	86
Abbildung 34: Einfluss von DEA/NO und BAY 41-8543 auf die NOsGC	86
Abbildung 35: Vergleich der NO- und Cinaciguat-stimulierten Aktivitäten des Wildtyp-Enzyms, der β_1 H105A-Mutante und der β_1 W22A-Mutante	87
Abbildung 36: Absorption der W22-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym und der H105-Mutante	88
Abbildung 37: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven des Wildtyp-Enzyms, der β_1 H105A-Mutante und der β_1 W22A-Mutante für Cinaciguat	88
Abbildung 38: Häufigkeit von Zell-Zell-Kontakten	90
Abbildung 39: Häufigkeit von Zell-Zell-Kontakten der verkürzten α_2 -Untereinheit	92
Abbildung 40: Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten	93
Abbildung 41: Einfluss von DETA/NO auf die Häufigkeit von fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten	94
Abbildung 42: Sequenzvergleich verschiedener α_2 -Untereinheiten	95
Abbildung 43: Häufigkeit von Zell-Zell-Kontakten der Erkennungssequenz-Mutanten	96
Abbildung 44: Erkennungssequenz der CaMKII in der α_2 -Untereinheit	97
Abbildung 45: Interaktion zwischen Scribble und α_2 / β_1	99
Abbildung 46: Zell-Zell-Kontakte in PC12-Zellen	100
Abbildung 47: Aufbau der FlncG-Fusionskonstrukte	102
Abbildung 48: Vergleich der Aktivität von $\beta_1\alpha_1$ FlncG mit dem Wildtyp-Enzym	103

Abbildung 49: Vergleich der Aktivität von $\beta_1\text{FlinG}\alpha_2$ mit dem Wildtyp-Enzym	103
Abbildung 50: Western Blot der FlincG-Fusionskonstrukte	104
Abbildung 51: Anstieg der Fluoreszenz der FlincG-Fusionskonstrukte unter Fluss	105
Abbildung 52: Intensitätsverlauf von FlincG und $\beta_1\alpha_1\text{FlinG}$ unter 8-Br-cGMP und DETA/NO	107
Abbildung 53: Intensitätsanstieg von FlincG und $\beta_1\alpha_1\text{FlinG}$ mit 8-Br-cGMP und DETA/NO	107
Abbildung 54: Perifusion von $\beta_1\alpha_1\text{FlinG}$ mit Cinaciguat	108
Abbildung 55: Vergleich des Intensitätsanstiegs von $\beta_1\alpha_1\text{FlinG}$ mit DETA/NO und Cinaciguat	109
Abbildung 56: Vergleich des Intensitätsanstiegs von $\beta_1\alpha_1\text{FlinG}$ mit DETA/NO und Cinaciguat	109
Abbildung 57: Lokalisation des Fusionskonstrukts $\beta_1\text{FlinG}\alpha_2$ in HEK293-Zellen	110
Abbildung 58: Intensitätsanstieg von $\beta_1\text{FlinG}\alpha_2$ unter DETA/NO	111
Abbildung 59: Konservierung der Tryptophane W22, W602 und W466	114
Abbildung 60: Strukturmodell der NOsGC von Fritz et al. 2013	117
Abbildung 61: Modell der NO-stimulierten Aktivierung der NOsGC	118
Abbildung 62: Bindetasche der Mant-Gruppe	122
Abbildung 63: Erkennungssequenz der PDZ 3 Domäne von Scribble im Vergleich zur carboxy-terminalen RETSL-Sequenz von α_2	132
Abbildung 64: Modell der FlincG-Fusionkonstrukte	137

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht der gemessenen Proben und Kanäle.	57
Tabelle 2: Vergleich der spezifischen Aktivität der Mutanten mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms	67
Tabelle 3: FRET-Effizienzen der Mutanten unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen	71
Tabelle 4: Vergleich der spezifischen Aktivität der Mutanten mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms	79
Tabelle 5: Spezifische CO und BAYS 41-8548 -stimulierte Aktivität ausgewählter Mutanten	80

11 ANHANG

11.1. Aktivitätsdaten der Tryptophan-Mutanten

<u>DEA/NO</u>	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]		x-fache Stimulation basal	Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]	
Enzyme	basal	DEA/NO	DEA/NO	basal	DEA/NO
α_1S / β_1	252,4 ± 73,8	8446,4 ± 2042,6	33,5	100	100
α_1S / β_1 W22F	199,9 ± 126,7	2443,7 ± 270,1	12,2	79,2 ± 50,2	28,9 ± 3,2
α_1S W669A / β_1	413,0 ± 138,2	6484,5 ± 955,1	15,7	163,6 ± 54,8	76,8 ± 11,3
α_1S W352F / β_1	67,3 ± 37,0	1830,2 ± 407,3	27,2	26,7 ± 14,6	21,7 ± 4,8
α_1S / β_1 W602F	253,3 ± 174,2	3037,7 ± 475,6	12,0	100,3 ± 69,0	36,0 ± 5,6
α_1S W466F / β_1	50,6 ± 8,9	1054,6 ± 267,5	20,8	20,1 ± 3,5	12,4 ± 3,2
α_1S W352F W669A / β_1 W22F W602F	203,2 ± 112,3	3461,0 ± 802,2	17,0	80,5 ± 44,5	42,7 ± 9,5
α_1S W352F W669A / β_1 W602F	275,5 ± 86,5	2691,1 ± 216,4	9,8	109,1 ± 34,3	31,9 ± 2,6
α_1S / β_1 H105A	1286,3 ± 512,7	1359,7 ± 509,3	1,1	509,5 ± 203,1	16,1 ± 6,0

<u>CO</u>	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]		x-fache Stimulation basal	Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]	
Enzyme	basal	CO	CO	basal	CO
α_1S / β_1	252,4 ± 73,8	171,4 ± 132,0	0,7	100	100
α_1S W466F / β_1	50,6 ± 8,9	49,7 ± 6,0	1,0	20,1 ± 3,5	29,0 ± 3,5
α_1S W352F W669A / β_1 W22F W602F	203,2 ± 112,3	113,2 ± 84,4	0,6	80,5 ± 44,5	66,0 ± 49,3
α_1S W352F W669A / β_1 W602F	275,5 ± 86,5	178,8 ± 16,4	0,6	109,1 ± 34,3	104,3 ± 9,6

<u>BAY 41-2272</u>	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]		x-fache Stimulation basal	x-fache Stimulation DEA/NO	Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]	
Enzyme	BAY 41-2272	BAY 41-2272 + DEA/NO	BAY 41-2272 + DEA/NO	BAY 41-2272 + DEA/NO	BAY 41-2272	BAY 41-2272 + DEA/NO
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$	2996,3 ± 723,0	16523,1 ± 3285,8	11,9	2,0	100	100
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ W22F	687,2 ± 335,9	4982,9 ± 2173,0	3,4	2,0	22,9 ± 11,2	30,2 ± 13,2
$\alpha_1\text{S}$ W669A / β_1	1371,5 ± 408,9	9586,6 ± 2747,1	3,3	1,5	45,8 ± 13,6	58,0 ± 16,6
$\alpha_1\text{S}$ W352F / β_1	322,5 ± 34,9	3095,5 ± 629,3	4,8	1,7	10,8 ± 1,2	18,7 ± 3,8
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ W602F	449,6 ± 99,8	1929,9 ± 409,3	1,8	0,6	15,0 ± 3,3	11,7 ± 2,5
$\alpha_1\text{S}$ W466F / β_1	873,9 ± 413,4	9404,9 ± 1256,3	17,3	8,9	29,2 ± 13,8	56,9 ± 7,6
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W22F W602F	1763,8 ± 493,9	7863,6 ± 869,5	8,7	2,3	58,9 ± 16,5	47,6 ± 5,3
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W602F	1401,9 ± 330,2	12029,1 ± 970,4	5,1	4,5	46,8 ± 11,0	72,8 ± 5,9
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ H105A	547,0 ± 18,4	257,4 ± 65,5	0,4	0,2	18,3 ± 0,6	1,6 ± 0,4

<u>BAY 41-2272</u>	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]		x-fache Stimulation basal	x-fache Stimulation BAY 41-8543	Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]	
Enzyme	BAY 41-2272	BAY 41-2272 + CO	BAY 41-2272 + CO	BAY 41-2272 + CO	BAY 41-2272	BAY 41-2272 + CO
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$	2996,3 ± 723,0	6195,9 ± 1830,3	24,5	2,1	100	100
$\alpha_1\text{S}$ W466F / β_1	873,9 ± 413,4	1912,1 ± 1284,9	37,8	2,2	29,2 ± 13,8	30,9 ± 20,7
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W22F W602F	1763,8 ± 493,9	2409,1 ± 948,8	11,9	1,4	58,9 ± 16,5	38,9 ± 15,3
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W602F	1401,9 ± 330,2	2095,9 ± 303,9	7,6	1,5	46,8 ± 11,0	33,8 ± 4,9

<u>BAY 41-8543</u>	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]		x-fache Stimulation basal	x-fache Stimulation DEA/NO	Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]	
Enzyme	BAY 41-8543	BAY 41-8543 + DEA/NO	BAY 41-8543 + DEA/NO	BAY 41-8543 + DEA/NO	BAY 41-8543	BAY 41-8543 + DEA/NO
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$	3726,2 ± 939,9	16557,9 ± 2867,6	65,6	2,0	100	100
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ W22F	1368,8 ± 164,2	7902,7 ± 40,5	39,5	3,2	36,7 ± 4,4	47,7 ± 0,2
$\alpha_1\text{S}$ W669A / β_1	3101,1 ± 419,9	14934,3 ± 394,6	36,2	2,3	83,2 ± 11,3	90,2 ± 2,4
$\alpha_1\text{S}$ W352F / β_1	956,4 ± 162,3	5438,4 ± 7,3	80,8	3,0	25,7 ± 4,4	32,8 ± 0,04
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ W602F	1120,9 ± 143,6	10792,4 ± 627,4	42,6	3,6	30,1 ± 3,9	65,2 ± 3,8
$\alpha_1\text{S}$ W466F / β_1	1156,2 ± 508,1	8876,2 ± 1149,4	175,3	8,4	31,0 ± 13,6	53,6 ± 6,9
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W22F W602F	1794,5 ± 518,5	7132,8 ± 889,8	35,1	2,1	48,2 ± 13,9	43,1 ± 5,4
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W602F	1451,1 ± 232,9	12250,2 ± 801,2	44,5	4,6	38,9 ± 6,3	74,0 ± 7,8
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$ H105A	1535,9 ± 257,3	2668,3 ± 294,5	2,1	2,0	41,2 ± 6,9	16,1 ± 1,8

<u>BAY 41-8543</u>	Spezifische Guanylat-Cyclase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹]		x-fache Stimulation basal	x-fache Stimulation BAY 41-8543	Anteil der spezifischen Aktivität der Mutanten am Wildtyp-Enzym [%]	
Enzyme	BAY 41-8543	BAY 41-8543 + CO	BAY 41-8543 + CO	BAY 41-8543 + CO	BAY 41-8543	BAY 41-8543 + CO
$\alpha_1\text{S} / \beta_1$	3726,2 ± 939,9	5493,0 ± 1816,8	21,8	1,5	100	100
$\alpha_1\text{S}$ W466F / β_1	1156,2 ± 508,1	2001,2 ± 1465,7	39,5	1,7	31,0 ± 13,6	36,4 ± 26,7
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W22F W602F	1794,5 ± 518,5	2265,6 ± 1218,6	11,1	1,3	48,2 ± 13,9	41,2 ± 22,2
$\alpha_1\text{S}$ W352F W669A / β_1 W602F	1451,1 ± 232,9	1864,0 ± 253,8	6,8	1,3	38,9 ± 6,3	33,9 ± 4,6

11.2. Proteinsequenzen der Fluoreszenzsensoren

FlnG

```

1  MSELLEDFAK  ILMLKEERIK  ELEKRLPEKE  EEIQELKRKL  HKCQSVLPVP  STHIGPRTR
61  AQGISAEPQT  YRSFHDLRQA  FRKFTKSERS  KDLIKEAILD  NDFMKNLELS  QIQEIVDCMY
121 PVEYGKDSCL  IKEGDVGSVL  YVMEDGKVEV  TKEGVKLCTM  GPGKVFGEAL  ILYNCTRTAT
181 VKTLVNVKLW  AIDRQCFQTI  MMRTGLIKHT  EYMEFLKSVP  TFQSLPEEIL  SKLADVLEET
241 HYEIGEYIIR  QGARGDTFFI  ISKGKVNVT  EDSNEDPVF  LRTLKGKDF  GEKALQGEDV
301 RTANVIAAEA  VTCLVIDRDS  FKHLIGGLDD  VSNINVIYIMAD  KQKNGIKANF  KIRHNIEDGG
361 VQLAYHYQQN  TPIGDGPVLL  PDNHYLSTQS  KLSKDLNEKR  DHMVLLFVLT  AAGITLGMDE
421 LYKGGTGGSM  VSKGEELFTG  VVPILVELDG  DVNGHKFSVS  GEGEGDATYG  KLTCLKFICTT
481 GKLPVPWPTL  VTTLTYGVC  FSRYPDHMKQ  HDFFKSAMPE  GYIQERTIFF  KDDGNYKTRA
541 EVKFEGDTLV  NRIELKGIDF  KEDGNILGHK  LEYN

```

PKG I, GFP (1-145), GFP (150-239)

$\beta_1\alpha_1$ FlnG

```

1  MYGFVNHALE  LLVIRNYGPE  VWEDIKKEAQ  LDQEGQFLVR  IIYDHSKTYD  LVAAASKVLN
61  LNAGEILQMF  GKMFFVFCQE  SGYDTILRVL  GSNVREFLQN  LDALHDHLAT  IYPGMRAPSF
121 RCTDAEKKGK  LILHYYSERE  GLQDIVIGII  KTVAAQIHGT  EIDMKVIQQR  SEECDHTQFL
181 IEEKESKEED  FYEDLDRFEE  NGTQDSRISP  YTFCKAFPFH  IIFDRDLVVT  QCGNAIYRVL
241 PQLQPGKCSL  LSVFSLVRPH  IDISFHGILS  HINTVFVLR  KEGLLDVEKL  ECEDELTGAE
301 ISCLRLKGQM  IYLPEADSIL  FLCSPSVMNL  DDLTRRGLYL  SDIPLHDATR  DLVLLGEQFR
361 EYKLTQELE  ILTDRLQLTL  RALEDEKKKT  DTLLYSVLPP  SVANELRHKR  PVPKRYDNV
421 TILFSGIVGF  NAFCSKHASG  EGAMKIVNLL  NDLYTRFDL  TDSRKNPFVY  KVETVGDKYM
481 TVSGLPEPCI  HHARSICHLA  LDMMEIAGQV  QVDGESVQIT  IGIHTGEVVT  GVIGQRMPLY
541 CLFGNTVNLT  SRTETTGEKG  KINVSEYTYR  CLMSPENSDP  QFHLEHRGPV  SMKGKKEPMQ
601 VWFLSRKNTG  TEETNQDENK  MFCRKFKDLK  ITGECPFSL  APGQVPTEPI  EEVAGVSESC
661 QATLPTCQEF  AENAEGSHPQ  RKTSRNRVYL  HTLAESIGKL  IFPEFERLNL  ALQRTLAKHK
721 IKENRNSSEK  EDLERIIAE  AIAAGVPVEV  LKDSLGEELF  KICYEDEDEHI  LGVVGGLTKD
781 FLNSFSTLLK  QSSHCQEAER  RGRLEDASIL  CLDKDQDFLN  VYFFPKRTT  ALLLPGIICA
841 AARILYESHV  EVSLMPPCFR  SECTEFVNQP  YLLYSVHVKS  TKPSLSPGKP  QSSLVIPTSL
901 FKCTFPFHFM  LDRDLAILQL  GNGIRRLVNK  RDFQKPNFE  EFFEILTPKI  NQTFSGIMTM
961 LNMQFVIRVR  RWDNLVKKSS  RVMDLKGQMI  YIVESSAILF  LGSPCVDRL  DFTGRGLYLS
1021 DIPIHNALRD  VVLIGEQARA  QDGLKKRLGK  LKATLEHAHQ  ALEEEKKKT  DLLCSIFPSE
1081 VAQQLWQGQI  VQAKKFNEVT  MLFSDIVGFT  AICSQCSPLQ  VITMLNALYT  RFDQQCGELD
1141 VYKVETIGDA  YCVAGGLHRE  SDTHAVQIAL  MALKMMELSN  EVMSPHGEPI  KMRIGLHSGS
1201 VFAGVGVVKM  PRYCLFGNNV  TLANKFESCS  VPRKINVSP  TYRLLKDCPG  FVFTPRSREE
1261 LPPNFPSDIP  GICHFLDAYQ  HQGPNSKPWF  QQKDAEDGNA  NFLGKASGVD  SRLEAMSELE
1321 EDFAKILMLK  EERIKELEKR  LPEKEEEEIQE  LKRKLHKCQS  VLPVPSTHIG  PRTRAQGIS
1381 AEPQTYRSFH  DLRQAFRKFT  KSERSKDLIK  EAILDNDFMK  NLELSQIQEI  VDCMYPVEYG
1441 KDSCIIKEGD  VGSLVYVMED  GKVEVTKEGV  KLCTMGPGKV  FGELAILYNC  TRTATVKTIV
1501 NVKLWAIDRQ  CFQTIMMRTG  LIKHTEYMEF  LKSVPTFQSL  PEEILSKLAD  VLEETHYEIG
1561 EYIIRQGARG  DTFFIISKGK  VNVTREDSN  EDPVFLRTL  KGDFWGEKAL  QGEDVRTANV
1621 IAAEAFTCLV  IDRDSFKHLI  GGLDDVSNNV  YIMADKQKNG  IKANFKIRHN  IEDGGVQLAY
1681 HYQONTPIGD  GPVLLPDNHY  LSTQSKLSKD  LNEKRDHML  LEFVTAAGIT  LGMDLYKGG
1741 TGGSMVSKGE  ELFTGVVPIL  VELDGDVNGH  KFSVSGEGEG  DATYGLTLK  FICTTGKLPV
1801 PWPTLVTTLT  YGVQCFSRYP  DHMKQHDFFK  SAMPEGYIQE  RTIFFKDDGN  YKTRAEVKFE
1861 GDTLVNRIEL  KGIDFKEDGN  ILGHKLEYN

```

beta 1, alpha 1, FlnG

β_1 FlincGa₂

```

1  MYGFVNHALE  LLVIRNYGPE  VWEDIKKEAQ  LDQEGQFLVR  IIYDHSKTYD  LVAAASKVLN
61  LNAGEILQMF  GKMFFVFCQE  SGYDTILRVL  GSNVREFLQN  LDALHDHLAT  IYPGMRAPSF
121 RCTDAEKKGK  LILHYYSERE  GLQDIVIGII  KTVAQQIHGT  EIDMKVIQQR  SEECDHTQFL
181 IEEKESKEED  FYEDLDRFEE  NGTQDSRISP  YTFCKAFPFH  IIFDRDLVVT  QCGNAIYRVL
241 PQLQPGKCSL  LSVFSLVRPH  IDISFHGILS  HINTVFVLRS  KEGLLDVEKL  ECEDELTGAE
301 ISCLRLKGQM  IYLPEADSIL  FLCSPSVMNL  DDLTRRGLYL  SDIPLHDATR  DLVLLGEQFR
361 EEFYKLTQELE  ILTDRLQLTL  RALEDEKKKT  DTLLYSVLPP  SVANELRHKR  PVPKRYDNV
421 TILFSGIVGF  NAFCSKHASH  EGAMKIVNLL  NDLYTRFDTL  TDSRKNPFVY  KVETVGDKYM
481 TVSGLPEPCI  HHARSICHLA  LDMMEIAGQV  QVDGESVQIT  IGIHTGEVVT  GVIGQRMPLY
541 CLFGNTVNL  SRTETTGEKG  KINVSEYTYR  CLMSPNSDP  QFHLEHRGPV  SMKGGKEPMQ
601 VWFLSRKNTG  TEETNQDENC  SRLEAMSELE  EDFAKILMLK  EERIKELEKR  LPEKEEEIQE
661 LKRKLHKCQS  VLPVPSTHIG  PRTTRAQGIS  AEPQTYRSFH  DLRQAFRKFT  KSERSKDLIK
721 EAILDNDFMK  NLELSQIQEI  VDCMYPVEYG  KDSCIIEGD  VGSLVYVME  GKVEVTKEGV
781 KLCTMGPGKV  FGELAILYNC  TRTATVKTIV  NVKLWAIDRQ  CFQTIMMRGT  LIKHTYMEF
841 KLSVPTFQSL  PEEILSKLAD  VLEETHYEIG  EYIIRQGARG  DTFFIISKRG  VNVTRDSPN
901 EDPVFLRTL  KGDWFGKAL  QGEDVRTANV  IAAEAVTCLV  IDRDSFKHLI  GGLDDVSNNV
961 YIMADKQKNG  IKANFKIRHN  IEDGGVQLAY  HYQQNTPIGD  GPVLLPDNHY  LSTQSKLSKD
1021 LNEKRDHML  LEFVTAAGIT  LGMDLYKGG  TGGSMVSKGE  ELFTGVVPIL  VELDGDVNGH
1081 KFSVSGEGEG  DATYGKLT  LK  FICTTGKLPV  PWPTLVTTLT  YGVQCFSRYP  DHMKQHDFFK
1141 SAMPEGYIQE  RTIFFKDDGN  YKTRAEVKFE  GDTLVNRIEL  KGIDFKEDGN  ILGHKLEYNS
1201 GLRSRAQASN  CHHHHCVPAS  TTTTATITTT  TAAAAVSAA  VVSPSSMSRR  KISSESFSSL
1261 GSDYLETSPE  EEGECPLSKL  CWNGSRSPPG  PPGSRAAAMA  ATPVPAASVA  AAAAAVAAGS
1321 KRAQRRRRVN  LDSLGESISL  LTAPSPQTIH  MTLKRTLQYY  EHQVIGYRDA  EKNFHNISNR
1381 CSSADHSNKE  EIEDVSGILR  CTANVLGLKF  QEIQERFGEE  FFKICFDENE  RVLRAVGSTL
1441 QDFFNGFDAL  LEHIRTSFGK  QATLESPSFL  CKELPEGTKL  LHYFHPHHTV  GFAMLGMIKA
1501 AGKRIYHLNV  EVEQIENEKF  CSDGSTPSNY  SCLTFLIKEC  ETTQITKNIP  QGTSQIPTDL
1561 RISINTFCRT  FPFHLMFDPN  MVVLQLGEG  RKQLRCDNHK  VLKFEDCFEI  VSPKVNATFD
1621 RVLLRLSTPF  VIRTKEASG  TDNEDKVM  KGQMIHVPES  NAILFLGSPC  VDKLDELIGR
1681 GLHLSDIPIH  DATRDVILVG  EQAKAQDGLK  KRMDKLKATL  EKTHQALEEE  KKKTVDLLYS
1741 IFPGDVAQQL  WQRQQVQARK  FDDVTMLFSD  IVGFTAICAQ  CTPMQVISML  NELYTRFDHQ
1801 CGFLDIYKVE  TIGDAYCVAS  GLHRKSLCHA  KPIALMALKM  MELSEEVLTP  DGRPIQMRIG
1861 IHSGSVLAGV  VGVRMPLYCL  FGNNVTLASK  FESGSHPRRI  NISPTTYQLL  KREDSFTFIP
1921 RSREELPDNF  PKEIPGVCYF  LELRTGPKPP  KPSLSSSRIK  KVSYNIGTMF  LRETSI
//
beta 1, alpha 2, FlincG

```

DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2009 bis Oktober 2013 am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Sönke Behrends, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Ich danke ihm herzlich für die umfassende Betreuung und ständige Unterstützung, für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und für die zahlreichen, anregenden Gespräche und Diskussionen.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Professor Dr. Ingo Rustenbeck. Bei Herrn Seniorprofessor Dr. Theodor Dingermann bedanke ich mich für die Übernahme des Drittgutachtens. Außerdem danke ich den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission: Frau Professor Dr. Christel Müller-Goymann und Herrn Professor Dr. Conrad Kunick.

Bei Dr. Tobias Haase, Dr. Nadine Haase, Inga Neidhardt, Elena Puhlmann und Mateja Lumpert bedanke ich mich für ihren tatkräftigen Einsatz bei den praktischen Arbeiten.

Besonderer Dank geht an Ines Thomsen, Gerlind Henze-Wittenberg, Anja Stieler und Ines Glöckner für die großartige technische Unterstützung und die ständige Hilfsbereitschaft.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Instituts, die meinen Weg begleitet haben, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Bei meinen Eltern möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mein Interesse für die Naturwissenschaften geweckt und mich ständig und uneingeschränkt unterstützt haben.